

Opptak og effekter på torsk av miljøgifter fra sediment

Ingrid Aarre



Masteroppgave i toksikologi, Biologisk institutt

UNIVERSITETET I OSLO

01.02.2008

Forord

Denne masteroppgaven ble utført i samarbeid med Norsk institutt for vannforskning (NIVA). Fagrådet for vann- og avløpsteknisk samarbeid i indre Oslofjord finansierte deler av studien. Takk for at dere bidro til å muliggjøre forsøkene i denne masteroppgaven.

Takk til mine supre veiledere Ketil Hylland og Anders Ruus. Til tross for at dere alltid har mye å gjøre, har dere bestandig vært tilgjengelige til å hjelpe og svare på spørsmål. Jeg føler meg privilegert som har fått anledning til å utføre denne studien sammen med dere.

En stor takk til alle ansatte på NIVA på Solbergstrand som tok seg av fisk og børstemark før og under forsøkene. En spesiell takk til Sigurd og Nasir som føret fiskene i perioder hvor jeg var bortreist. Takk også til Sigurd for hjelp til prøvetaking av fisk. Mange takk også til Oscar og Tor Fredrik på NIVA CIENS for god hjelp på laben.

Takk til alle medstudenter for samtaler, diskusjoner, samarbeid og moro i løpet av studietiden. En spesiell takk til Marte og Bjørnar for eminent lab-samarbeid.

Til alle i familien som har fulgt meg opp og støttet meg gjennom studietiden går en stor takk. En ekstra takk til pappa for støtte til datamaskin og hjelp til å lese korrektur.

Til slutt, takk til min kjære Karsten som hele tiden har støttet meg, heiet på meg og lært meg til å tro at alt er mulig. Tusen takk for filmen om oppgaven!

Universitetet i Oslo, 01.02.2008

Ingrid Aarre

Sammendrag

Sedimentet i mange norske fjorder er betydelig forurensset, hovedsaklig som følge av menneskelig aktivitet. På bakgrunn av høye verdier av miljøgifter, er det fastsatt kostholdsrad på konsum av lever fra torsk i indre Oslofjord. For eventuelt å kunne bedre situasjonen, er det av interesse å forsøke å avdekke fra hvor og hvordan fisk akkumulerer og blir påvirket av miljøgifter i akvatiske omgivelser.

Siden forurensset sediment normalt er tilknyttet havner, vil båttrafikk og annen virksomhet kunne lede til oppvirvling av sedimentmassene og dermed potensielt øke biotilgjengeligheten til miljøgifter for fisk og andre organismer. Fisk kan også ta opp miljøgifter via byttedyr som har vært eksponert for sediment. I denne studien har man forsøkt å kvantifisere opptak av miljøgifter i torsk fra sediment enten via inntak av flerbørstemarken *Nereis virens*, eller direkte fra oppvirvlet sediment. Torsk (*Gadus morhua*) ble i denne sammenheng eksponert for et homogenisert sediment fra indre Oslofjord, eller et kontrollsediment, i maks 129 dager. Dette skjedde via konsum av børstemark, som hadde levd i et av sedimentene i minimum 2 måneder. Torsk ble i et annet forsøk eksponert direkte for oppvirvlet sediment fra indre Oslofjord eller for sedimentfrie omgivelser. Fiskene i begge forsøkene ble prøvetatt på ulike tidspunkter og analysert for akkumulering og effekter av miljøgifter.

PAH-er og PCB-er viste seg å akkumulere i torsk eksponert for forurensset sediment fra indre Oslofjord. Dette skjedde både som et resultat av konsum av flerbørstemark og gjennom eksponering for oppvirvlet sediment. Biotilgjengeligheten til ulike PAH-er og PCB-er viste seg å variere. Pyren var spesielt tilgjengelig av PAH-ene. Enkelte PCB-er så ut til å være lettere biotilgjengelig for torsk via *Nereis virens* enn direkte fra oppvirvlet sediment. Det ble ikke funnet noen induksjon av vitellogenin eller zona radiata i torsk eksponert for sediment fra indre Oslofjord via føden. Det var heller ingen klare tegn til induksjon av cytokrom P4501A.

Innhold

FORORD	3
SAMMENDRAG	5
INNHold	7
1. INNLEDNING	11
2. METODEKAPITTEL	17
2.1 INNSAMLING AV SEDIMENT	17
2.2 FORSØKSDYR	20
2.3 OPPVIRVLINGSFORSØKET	21
2.4 FØRINGSFORSØKET	23
2.5 PRØVETAKNING	27
2.6 MÅLING AV PAH-METABOLITTER	29
2.7 OPPARBEIDING AV LEVER	32
2.8 BIOMARKØRANALYSER	34
2.8.1 Kvantifisering av vitellogenin ved hjelp av ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)	34
2.8.2 Zona radiataportheinet, ELISA	37
2.8.3 Analyse av protein	39
2.8.4 CYP1A ELISA	41
2.8.5 EROD (7-etoksyresorufin O-deetylase)	42
2.9 KJEMISKE ANALYSER	44
2.10 STATISTISKE ANALYSER	45
3. RESULTATER	47
3.1 KJEMISKE ANALYSER AV SEDIMENTER	47

3.1.2 Kornstørrelse og karboninnhold i sedimentet	50
3.2 KJEMISKE ANALYSER AV BØRSTEMARK	50
3.3 FØRINGSFORSØKET	52
3.3.1 PAH-metabolitter i galle.....	52
3.3.2 Kjemiske analyser av torskens lever.....	58
3.3.3 CYP1A	63
3.3.4 EROD	64
3.3.5 VTG.....	66
3.3.6 ZRP	68
3.4 OPPVIRVLINGSFORSØKET.....	69
3.4.1 PAH-metabolitter i galle.....	69
3.4.2 Kjemiske analyser av fiskens lever	74
4. DISKUSJON.....	81
4.1 KONDISJON HOS FISKEN	81
4.2 FØRINGSFORSØKET	81
4.2.1 Akkumulering.....	82
4.2.2 PAH-metabolitter.....	85
4.2.3 Øvrige biomarkører.....	88
4.3 OPPVIRVLINGSFORSØKET.....	91
4.3.1 Akkumulering.....	92
4.3.2 PAH-metabolitter.....	93
4.4 SAMMENLIKNING AV RESULTATER I OPPVIRVLINGSFORSØKET OG FØRINGSFORSØKET.....	94
4.5 FORSØKSDESIGN	95
5. KONKLUSJONER.....	97

REFERANSER	101
VEDLEGG	109
ADRESSER	109
ANALYSER AV SEDIMENT	110
ANALYSER AV BØRSTEMARK.....	114
DATA FOR FISK I FØRINGSFORSØKET	116
DATA FOR FISK I OPPVIRVLINGSFORSØKET	124

1. Innledning

Som en konsekvens av høyt innhold av miljøgifter er det i flere norske fjorder fastsatt kostholdsveiledning for matinntak av fisk. Mattilsynet har derfor fastsatt kostholdsråd for konsum av lever fra fisk innenfor Horten og Jeløya (Økland, 2005). På bakgrunn av høye konsentrasjoner av miljøgifter i fisk, er det av interesse å forsøke å avdekke hvordan disse giftene kan påvirke, bli tatt opp og eventuelt akkumuleres i fisk. Det er dette som er tema for denne masteroppgaven. Bioakkumulering er prosessen som fører til en økt konsentrasjon av et stoff i en organisme i forhold til omgivelsene, forårsaket av opptak via alle eksponeringsveier, inkludert fødeopptak, transport over respirasjonsoverflatene og hud/skinn (Mackay og Fraser, 2000). Et stoff sies å akkumulere dersom opptaket i en organisme er større enn metabolisme og utskillelse.

Organiske forbindelser som polyaromatiske hydrokarboner (PAH-er) og polyklorerte bifenyler (PCB-er) er spesielt bekymringsfulle i miljøsammenheng på grunn av deres veldokumenterte giftighet (Heintz et al., 2000; White et al., 1999) og mulige karsinogenitet (Bend et al., 1977). Samtidig er også særlig PCB-er persistente (Ross og Birnbaum, 2003). Miljøgifter som PCB-er og PAH-er har hovedsaklig ankommet det marine miljøet via industri, skipsfart og annen menneskelig aktivitet (Palmqvist et al., 2006; Soclo et al., 2000). Som ferdselsåre inn til landets hovedstad og en viktig havneby i Norge har Oslofjorden i alle år vært belastet med skipstrafikk samt avrenning fra byområdet og industri.

Sedimentet i indre Oslofjord er markert forurensset (se blant annet Konieczny (1999)). I hvilken grad miljøgifter i sedimenter kan lekke til omgivelsene og bli tatt opp av akvatiske organismer, er hovedanliggende og det kritiske spørsmålet tilknyttet miljøgifter i sedimenter. Det er biotilgjengeligheten av miljøgifter i sedimenter som er avgjørende i forhold til kunnskapen om hvorvidt sedimenter fungerer som kilde for utlekking av miljøgifter til omgivelsene, eller om sedimentet fanger opp giftene og virker som et "siste stoppested" ("source or sink") (Neff, 1984). Biotilgjengelighet defineres som andelen av et stoff som absorberes i et dyr for deretter å og

metaboliseres, lagres eller bli skilt ut (Fries et al., 1989). Konsentrasjonen av miljøgifter i sedimentet kan ikke alene gi et godt bilde av i hvilken grad disse miljøgiftene vil være biotilgjengelige med mulighet for akkumulering i næringskjeden (Cornelissen et al., 2005; Rubinstein et al., 1983). Rubinstein et al. (1983) viste at sedimenter med høyt innhold av PCB kunne gi en langt lavere bioakkumuleringsfaktor enn mindre forurensede sedimenter. Undersøkelser har vist at ikke-polare stoffer som PAH-er og PCB-er generelt er lite biotilgjengelige for marine dyr når stoffene er adsorbert i sedimentet. Men fordi konsentrasjonen av miljøgifter i sedimenter i forurensede områder ofte er relativt høy vil giftige stoffer kunne lekke ut fra sedimentet (Larsson, 1985).

Torsk (*Gadus morhua*) er en bunntilknyttet art som lever naturlig i Oslofjorden og langs hele norskekysten. Denne fiskearten vil derfor kunne bli eksponert for miljøgifter i sedimentet. Miljøgifter i sediment har vist seg å være biotilgjengelige for torsk og annen fisk (Beyer et al., 1996; Goksøyr et al., 1994; Stein et al., 1992; Varanasi et al., 1985). Giftene kan overføres til torsk enten direkte fra sedimentet ved utlekking eller via føden. PAH-er og PCB-er har vist seg å bioakkumulere i evertebrater (Leppanen og Kukkonen, 2000; Rubinstein et al., 1983; Ruus et al., 2005). Torsk beiter på flerbørstemark og andre bentiske organismer, spesielt i tidlige livsstadier (Scott et al., 2006), og vil på denne måten kunne få i seg miljøgifter fra sedimentet. I en modell utviklet av Thomann og Connolly (1984) kan det tyde på at opptil 99% av PCB-eksponeringen for ørret, som toppredator i en innsjø, kunne komme gjennom matinntaket.

For å undersøke om miljøgifter fra sediment akkumulerte i juvenil torsk via føden, ble børstemarken *Nereis virens* eksponert i minimum 2 måneder for sediment fra indre Oslofjord eller et kontrollsediment fra ytre Oslofjord før torsken ble føret med marken. Denne delen av oppgaven kalles fødingsforsøket. Om og i så fall i hvilken grad juvenil torsk vil akkumulere og blir påvirket av miljøgifter fra sedimentet via børstemarken *Nereis virens* er hovedspørsmålet i denne oppgaven.

Bioturbasjon og andre forstyrrelser av sedimenter har vist seg å kunne virke inn på tilgjengeligheten til miljøgifter (Ciarelli et al., 1999; Eggleton og Thomas, 2004; Van Hoof et al., 2001), men det er omdiskutert hvor omfattende denne virkningen er (Reynoldson, 1987). Skipstrafikken i indre Oslofjord forårsaker at forurensede sedimenter, særlig i havneområdet, virvles opp. Hvorvidt oppvirvling av sediment fra indre Oslofjord leder til at miljøgifter i sedimentet blir biotilgjengelige for torsk, har her vært det andre spørsmålet. Effekten av oppvirvling av sediment ble studert ved å overføre torsk til tanker med sediment fra indre Oslofjord og simulere oppvirvlingen slik den vil arte seg i det aktuelle miljøet ute i naturen. Denne delen av masteroppgaven kalles oppvirvlingsforsøket.

For måling av effekter på fisken ble det tatt prøver til biomarkøranalyser på ulike tidspunkt gjennom hele forsøket (hovedsakelige i fôringsforsøket). En biomarkør har flere ulike definisjoner (blant annet Peakall (1994)), hvorav den gitt av den uavhengige organisasjonen "English Nature (2004)" er foretrukket i dette prosjektet. English Nature definerer biomarkører som (sitater er oversatt til norsk fra engelsk): "biokjemiske, cellulære, fysiologiske eller adferdsmessige variasjoner i vev eller kroppsvæsker, eller forandringer på organismens holistiske nivå, som gir bevis på eksponering for kjemiske miljøgifter og som også kan indikere toksisk effekt".

PAH-er er hovedsaklig toksiske etter at de har blitt metabolsk aktiverte (Varanasi et al., 1985). Fisk har enzymsystemer som gjør at den kan bioaktivere PAH-er til reaktive metabolitter, som blant annet kan lede til kreft (Bend et al., 1977). Dersom fisk eksponeres for polysykliske aromatiske hydrokarboner (PAH-er) i miljøet bryter fisken disse raskt ned ved hjelp av biotransformasjon i leveren (Lee et al., 1972). Fordi PAH-er er lett nedbrytbare, bioakkumulerer normalt ikke stoffene i seg selv i så stor grad at akkumuleringen i fisken reflekterer eksponeringsnivået (Van der Oost et al., 2003). Dette gjør at de er vanskelige å detektere i vev og det er derfor vanlig å bruke metabolittene fra biotransformeringen som biomarkører for PAH-eksponering. PAH-metabolittene akkumuleres i gallen (Lee et al., 1972; Varanasi et al., 1985) og en vanlig metode for identifisering av disse er fast bølgelengde fluorescensdeteksjon

("fixed fluorescence detection") (Ariese et al., 2005). Denne metoden ble benyttet i dette prosjektet, for å anslå om fisken i fôringsforsøket og oppvirlingsforsøket hadde blitt eksponert for PAH-er fra sedimentet.

Fordi PAH-er og PCB-er er fettløselige går de gjennom to stadier av transformasjon (Parkinson, 2003). Disse innebærer henholdsvis hydroksylering og konjugering. Hydroksyleringen blir katalysert av cytokrom P4501A (CYP1A) gjennom interaksjon med aryl-hydrokarbonreseptoren (Ah-reseptoren) (Whyte et al., 2000). Eksponering for PAH-er kan dermed gi induksjon av CYP1A (Kleinow et al., 1987; Parkinson, 2003). I fôringsforsøket ble det utført en ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) på levervev fra fisken for å kvantifisere nivået av CYP1A over tid.

Omdanning av enzymet 7-etoksyresorufin til resorufin katalyseres av CYP1A (Burke og Mayer, 1974). Omfanget av denne omdanningsprosessen kalles EROD-aktivitet (7-etoksiresorufin *O*-deethylase) og er den mest brukte biomarkøren for induksjon av CYP1A. EROD har spesifisitet for plane hydrokarboner (Ruus et al., 2003) hvor av de mest potente induserende stoffene er kjemikalier med størst strukturell likhet med 2,3,7,8-tetraklordibenzo-*p*-dioksin (Whyte et al., 2000). For fisken i fôringsforsøket ble det undersøkt om en slik induksjon av EROD hadde funnet sted som følge av eksponering for miljøgifter gjennom føden.

Fordi organiske hydrokarboner har affinitet for fettvev vil organismer med høy fettprosent potensielt kunne akkumulere en høyere grad av dem enn magrere individer (Ruus et al., 2001). Kjemiske analyser av lever ble utført i både fôringsforsøket og sedimentforsøket for å undersøke om fettprosenten varierte over tid og for å kvantifisere innholdet av PCB-er i vevet. Innholdet av PAH-er og PCB-er ble også analysert i *Nereis virens* for å anslå andelen av miljøgifter i torskens føde.

Hydrofobe organiske kjemikalier oppnår likevekt i sedimenter gjennom diffusjonsmekanismer (Leppanen og Kukkonen, 2000). Likevekt innebærer et fast forhold mellom hydrofobe organiske kjemikalier i sedimentets partikler, i vannfasen og i organismens fettvev. Biotilgjengeligheten til forbindelser som PAH-er og PCB-

er direkte forbundet med sedimentets kornstørrelse, innhold av organisk materiale og stoffets løselighet (Cornelissen et al., 2006; Neff, 1984). Karboninnholdet i sediment blir ansett som spesielt viktig for biotilgjengeligheten. Jo mer organisk materiale og fine korn sedimentet inneholder, desto sterkere vil PAH-er og PCB-er være bundet opp i sedimentet. Kjemiske analyser ble utført på sedimentene i begge forsøkene for å kvantifisere karboninnhold og kornstørrelsen samt innholdet av PCB-er og PAH-er.

Det er akseptert at mange ulike kjemikalier i miljøet kan lede til hormonelle forandringer i fisk (Kime, 1995). Vitellogenin (VTG) og zona radiata (ZRP) er proteiner som utgjør henholdsvis kilde til næring i eggeplommen og bestanddel i eggeskall hos ovipare og ovovivipare vertebrater. Vitellogenin dannes i leveren som respons til 17β -østradiol (E_2) (Matsubara et al., 1999), som er det viktigste hunnlige kjønssshormonet i vertebrater. Vitellogenin og zona radiata produseres normalt hovedsakelig i hunnfisk (Van Veld et al., 2005) og det er ikke normalt med store mengder i av disse proteinene i juvenil fisk eller i hannfisk (Hylland og Haux, 1997), sannsynligvis på grunn av lave østrogenkonsentrasjoner (Arukwe et al., 1997). Det har seg likevel slik at E_2 og flere syntetiske kjemikalier kan indusere produksjonen av vitellogenin (Hylland og Haux, 1997) og zona radiata (Oppen-Berntsen et al., 1999) i hannfisk. Organiske miljøgifter som PAH-er og PCB-er har vært vist å kunne ha en svak østrogen effekt hos fisk (Nicolas, 1999). Induksjon av zona radiata og vitellogenin er svært sensitive responser (Arukwe et al., 2000; Van Veld et al., 2005) og vitellogenin og zona radiata brukes derfor som biomarkør for å identifisere og kvantifisere eksponering for østrogen og hormonhermende stoffer. Scott et al. (2006) fant induksjon av vitellogenin i hanntorsk fra Oslofjorden og konkluderte med at denne induksjonen sannsynligvis var et resultat av eksponering for hormonhermende stoffer.

De to hovedhypotesene for dette prosjektet har vært:

H_0 : Juvenil torsk akkumulerer ikke miljøgifter fra sediment via føde (børstemarken *Nereis virens*) eller direkte fra oppvirkvlet sediment etter kronisk eksponering.

H₀: Miljøgifter i føde eller oppvirvlet sediment påvirker ikke juvenil torsk etter kronisk eksponering.

Det har også blitt arbeidet ut fra følgende underhypoteser:

- Flerbørstemarken *Nereis virens* akkumulerer verken PCB eller PAH ved kronisk eksponering for forurenset sediment.
- Juvenil torsk eksponert for miljøgifter via føde (børstemarken *Nereis virens*) eller oppvirvlet sediment akkumulerer ikke PCB i leveren og levernivået endrer seg ikke over tid.
- Juvenil torsk eksponert for miljøgifter via føde (børstemarken *Nereis virens*) eller oppvirvlet sediment har ikke forhøyde nivåer av PAH-metabolitter i galle og disse nivåene endres ikke over tid.
- Eksponering av juvenil torsk for miljøgifter via føde (børsemarken *Nereis virens*) fører ikke til endring i plasmanivåer av biomarkørene vitellogenin eller zona radiata protein.
- Eksponering av juvenil torsk for miljøgifter via føde (børstemarken *Nereis virens*) fører ikke til endring i levernivåer av biomarkørene CYP1A eller EROD.

2. Metodekapittel

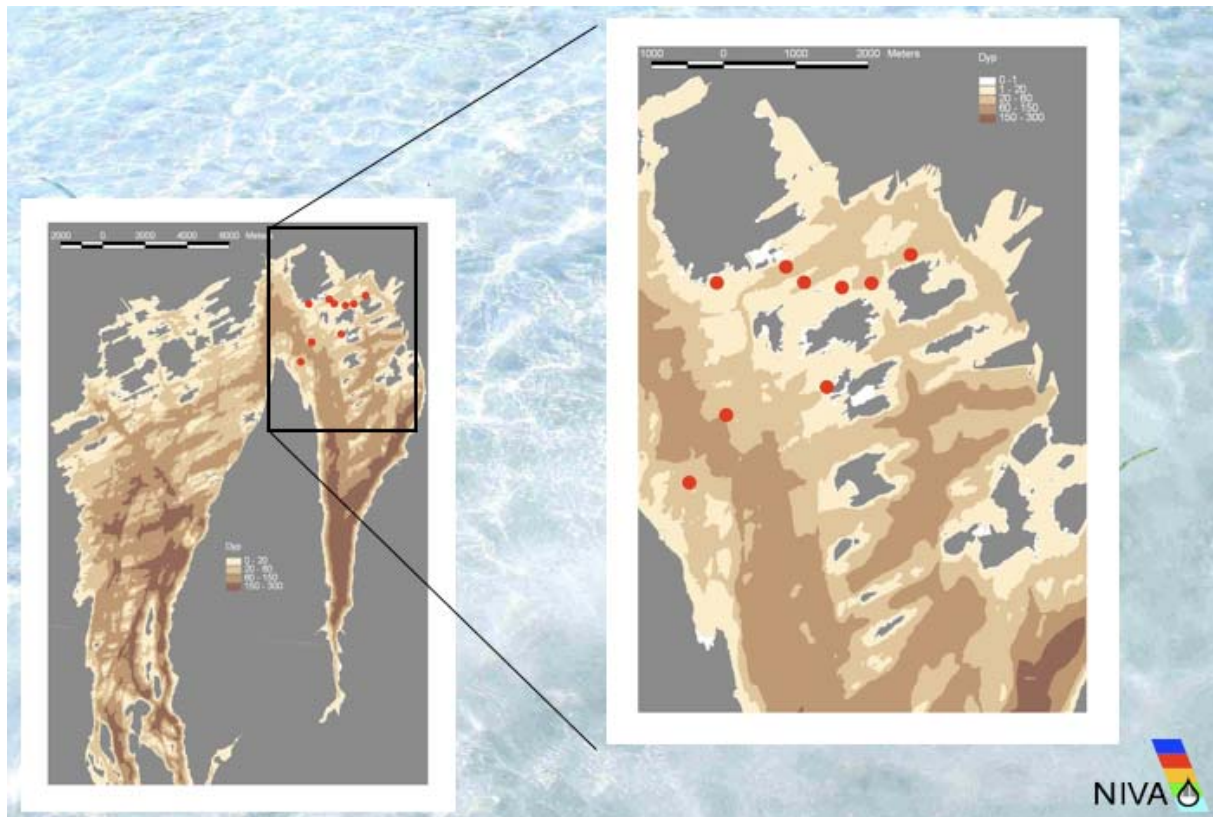
2.1 Innsamling av sediment

Sediment ble hentet fra lokaliteter i indre og ytre Oslofjord. Sedimentet fra ytre fjord ble innsamlet ved Rambergbukta vest for Jeløy. Fra indre Oslofjord ble sedimentet samlet inn fra forskningsfartøyet ”Trygve Braarud” den 15.03.2006. Sedimentet ble innsamlet ved hjelp av en 0,1 m² van Veen-grabb ombord på forskningsfartøyet og fordelt i store plastbakker. Sediment ble innsamlet ved følgende stasjoner (tabell 1):

Tabell 1 Oversikt over stasjoner for innsamling av sediment fra ytre Oslofjord

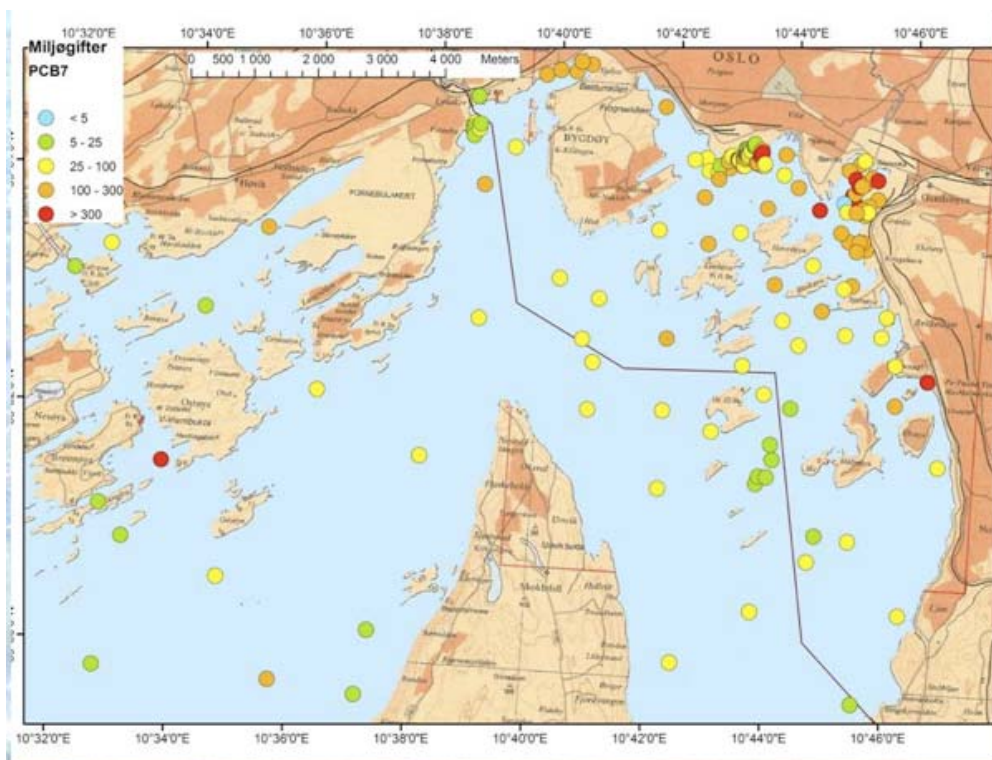
Grader N	Min N	Grader Ø	Min Ø
59	52,953	10	42,572
59	52,696	10	41,109
59	52,176	10	40,63
59	53,671	10	40,84
59	53,974	10	43,683
59	53,742	10	43,131
59	53,697	10	42,701
59	53,717	10	42,131
59	53,822	10	41,854

Sedimentet ble hovedsakelig samlet inn fra Heggholmen (N 59° 52, 696 Ø 10° 41, 109, figur 1).

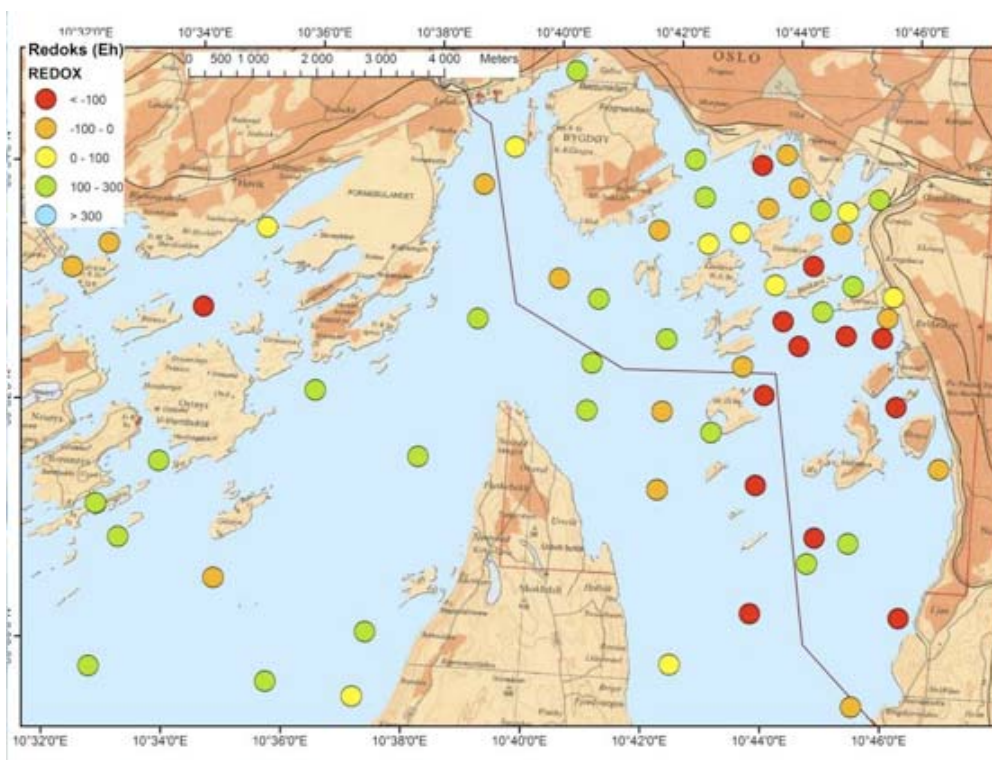


Figur 1 Lokalteter for innsamling av sediment i indre Oslofjord. Heggholmen, hvor det meste av sedimentet ble hentet fra, er vist med prikk nummer 2 nedenfra (Konieczny, 1999; Olsgard, 1995).

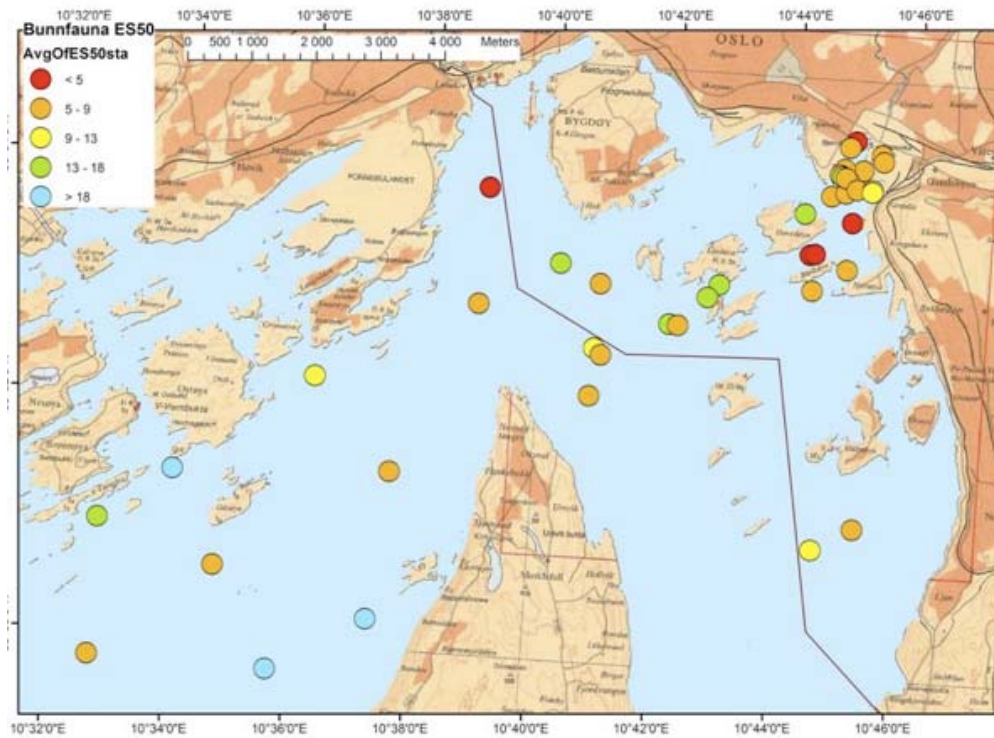
Før utvelgelsen av sediment ble det kartlagt hvordan nivået av PCB og oksygen var i sedimentet i området, og hvor rik bunnfaunaen var. Det var ønskelig å ha et markert forurensset sediment, samtidig som det måtte være mulig for *Nereis virens* å trives i det i lengre tid uten vesentlig dødelighet. Under vises gradering av de ulike faktorene i området, symbolisert med fargekoder i henhold til Statens forurensningstilsyn sitt klassifiseringssystem (SFT, 1997). Lys blå symboliserer mest gunstige forhold, mens det i områder med rød farge er dårligst forhold. Alle kartene er utarbeidet ved Norsk institutt for vannforskning (NIVA) i henhold til deres overvåkningsresultater (blant annet Konieczny (1999) og Olsgard (1995)). Ved Heggholmen er det et markert innhold av PCB i sedimentet (figur 2) og et lite til moderat redusert oksygennivå (figur 3). Bunnfaunaen er lite til sterkt redusert (figur 4).



Figur 2 Sum av PCB-7-kongerer (PCB-28, 52, 101, 118 138, 153 og 180), i sediment i indre Oslofjord (Konieczny, 1999; Olsgard, 1995).



Figur 3 Oksygenforhold i sediment i indre Oslofjord (Konieczny, 1999; Olsgard, 1995).



Figur 4 Bunnfauna (antall arter per 50 individer) i sediment i indre Oslofjord (Konieczny, 1999; Olsgard, 1995).

Kontrollsedimentet ble samlet inn fra ytre Oslofjord ved Rambergbukta på Jeløy i mai-juni 2006.

Sedimentet fra de ulike stasjonene ble siden homogenisert i en kontrollblanding (ytre fjord) og en forurenset blanding (indre fjord) ved hjelp av en mørtel-mikser.

2.2 Forsøksdyr

Nereis virens flerbørstemark ble kjøpt fra Seabait Limited (se adresser i vedlegg).

Tosken til oppvirvlingsforsøket ble kjøpt fra Marin Invest AS på Sandøya (se adresser i vedlegg) og torsken til fôringsforsøket fra Marine Harvest på Eggesbønes (se adresser i vedlegg). Fiskene til oppvirvlingsforsøket oppholdt seg på Solbergstrand forskningsstasjon i flere måneder før forsøket startet. Torsken til fôringsforsøket ankom Solbergstrand forskningsstasjon 24.11.07, 2 måneder før

forsøket startet. Før denne fisken ankom hadde den blitt fôret med Gemma micro, Gemma 0.3/0.5, Gemma 0.75/1.0/1.2, Europa respons 1.5 mm, Europa respons 2.0 mm og Europa respons 3.0 mm. Etter ankomst til Solbergstand og før forsøket startet, ble fisken til fôringsforsøket matet med Skretting Europa Respons, 3 mm og 4 mm. Leverandøren av alt fôr var Skretting (se adresser i vedlegg).

2.3 Oppvirvlingsforsøket

Torsk på 150-200 gram ble overført 6 kar på 45 x 110 x 110 cm, hvorav 3 av karene inneholdt et 16 cm tykt lag med sedimentet fra indre Oslofjord. De resterende 3 karene var uten sediment (figur 5). Sedimentet som ikke ble brukt i oppvirvlingsforsøket ble lagret kjølig, overdekket med vann og tilført luftbobling fra en akvariepumpe. Det lagrede sedimentet ble siden brukt i fôringsforsøket. Fisken i oppvirvlingsforsøket ble fordelt likt på de 6 karene slik at halvparten ble eksponert for sedimentet og halvparten gikk i rene omgivelser. Det var dermed to grupper av torsk, hvorav den ene gruppen utgjorde eksponert fisk og den andre en kontrollgruppe. Det var 13 fisk i hvert kar ved dag 0. For å hindre at fiskene rømte, ble det festet netting over karene. Nettingen ble holdt på plass av en treramme. I tillegg var akvariene delvis skjult av en presenning slik at torsken ble utsatt for minst mulig stress. Forsøket startet 24/3-2006.



Figur 5 Oppvirvlingsforsøk. Fisk eksponert for sediment fra indre Oslofjord til venstre, kontrollfisk til høyre. Foto: Anders Ruus

Karene hadde kontinuerlig tilførsel av vann (8 liter/min). Vannet ble tilført via en slange på 60 meters dyp i Oslofjorden utenfor forskningsstasjonen på Solbergstrand. Via et sluk med filter, i den øvre kanten av karene, var det i tillegg en jevn strøm av vann ut. Slik ble det sikret at torskene til enhver tid hadde tilgang på oksygenrikt (75% metning) og friskt vann. Temperaturen var gjennomsnittlig på 7,4°C med en variasjon på mellom 6,3 og 9,2°C. Saliniteten var gjennomsnittlig på 34,6 og varierte mellom 34,2 og 34,9. Fiskene ble fôret tre ganger i uka med Skretting Europa Respons, 3 mm og 4 mm pellet etter behov gjennom hele forsøket. Fiskene ble daglig fôret med omtrent 1% av kroppsvekten. Fiskene skulle ikke vokse i løpet av forsøket og det var derfor viktig å ikke gi for mye mat.

Sedimentet ble forstyrret for å simulere andelen oppvirvlet sediment som torsk vil utsettes for i indre Oslofjord. I begynnelsen av forsøket sto fisken selv for oppvirvling av sedimentet ved hjelp av egen bevegelse. Mekanisk forstyrrelse av sedimentet startet derfor først ved dag 97 av forsøket ved hjelp av en Bosch P9B 600 RE drill med propell (se adresser i vedlegg). På dette tidspunktet var det ikke lenger nok fisk igjen i karene til at forstyrrelsen av sedimentet var tilstrekkelig. Under propellvirksomheten ble det passet på å unngå skader på fisken. Det ble også forsøkt

å unngå at oppvirvlet sediment forsvant med utløpsvannet ved å virvle sedimentet opp vekk fra avløpene.

Dagen før forsøksstart (det vil si dagen før dag 0), dag 66 og dag 129 ble det tatt prøver av sedimentene i hvert av de 3 karene med sediment. Sedimentet ble sendt til kjemisk analyse ved dag 0.

2.4 Fôringsforsøket

Dette forsøket hadde to steg. Det første dreide seg om å eksponere børstemarken *Nereis virens* for sediment enten fra indre eller ytre Oslofjord. Sedimentet fra indre Oslofjord var det samme som ble brukt i oppvirvlingsforsøket, og lokaliteter for innsamling av sediment fra ytre Oslofjord var som oppgitt ovenfor. I den andre delen av forsøket ble torsk, *Gadus morhua*, fôret med børstemark som hadde vært eksponert for sedimentet.

Nereis virens ble overført 10-liters bøtter med lokk som inneholdt sediment fra lokaliteter enten fra indre (eksponert gruppe) eller ytre Oslofjord (kontrollgruppe). Det ble tilsatt 20-35 mark i hver bølge og det var til sammen 20-22 bøtter i hver gruppe. I tillegg ble det satt opp 2 ekstra akvarier med reservemark for hver av gruppene. Bøttene og akvariene var plassert på et bord dekket med en plastduk. Det var kontinuerlig tilførsel av vann til bøttene, ca 250 ml i minuttet, via en slange som gikk inn gjennom et hull i bøttelokket. Alt vannet som rant ut av bøttene kom ut via et hull i bordet. Dette vannet ble ledet over i en murerstamp og tilsatt klor (natriumhypoklorittløsning) ved hjelp av en pumpe. Avløpsvannet fikk litt oppholdstid i klorbadet før det ble pumpet ut til videre avløp. Klormengden ble forsøkt holdt på ca 0,3 mg/l. Avfallet fra *Nereis virens*, og alt sediment som hadde vært i kontakt med børstemarken, ble kloret før det ble ført til avløp.

Sedimentet ble ikke fylt helt til toppen av bøttene, men det var ca 15-20 cm fra sedimentet sluttet og opp til bøttekanten. Litt ovenfor der hvor sedimentlaget sluttet, hadde bøttene et hull på ca 5 cm i diameter tildekket med netting. Slik kunne vann

kontinuerlig renne ut av bøttene, samtidig som nettingen hindret at *Nereis virens* rømte. Det ble daglig kontrollert at det var en jevn strøm med vann ut av bøttene gjennom nettinghullet. Dersom vannsirkulasjonen ikke var god nok i bøttene, ble det anoksiske forhold og økende fare for dødelighet hos flerbørstemarken.

Nereis virens ble fôret med pellets av typen ”Skretting advanced fish feed Coarse fish – 23” bestående av soyabønneekstrakt, hvete, mais, fiskemel, fiskeolje (figur 6). Det ble fôret 3 ganger i uka. Ved hver fôring ble 1 til 2 gram tilført hver bølge avhengig av om alt fôret var spist opp eller ikke. Det ble ikke fôret mer enn at det ved neste fôring ikke var matrester igjen.



Figur 6 *Nereis virens* kommer opp fra sedimentet for å spise. Foto: Joachim Tørum Johansen

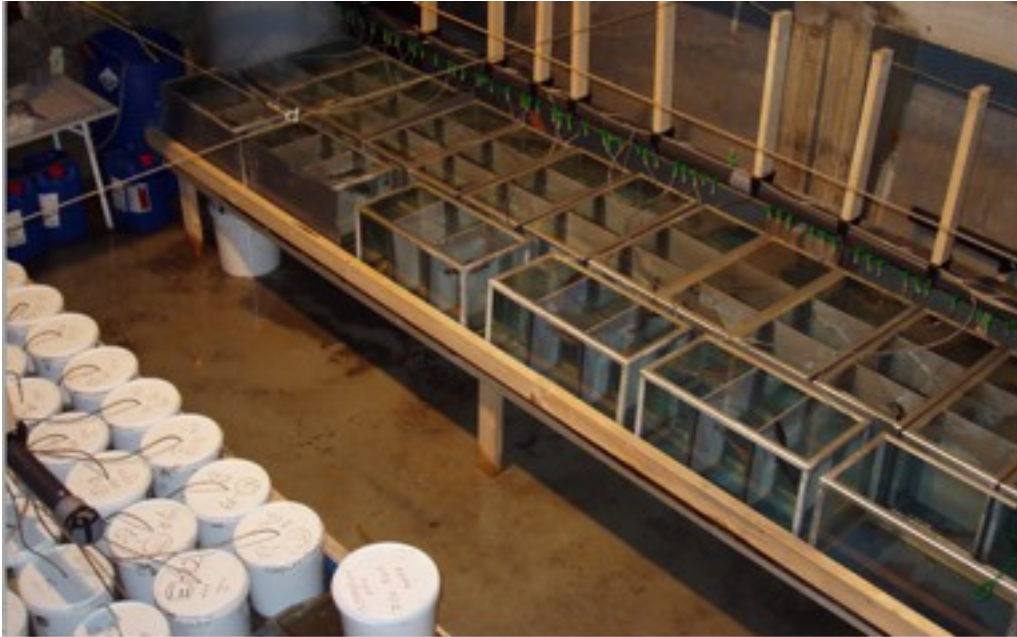
Det var to runder hvor mark ble eksponert for sediment. Ved første eksponeringsrunde ble børstemarkene overført bølter med sediment dagen etter ankomst til Norge. I andre runde ble markene tilsatt samme dagen de ankom. Det viste seg at dødeligheten av mark var større dersom man ventet til dagen etter. Det ble tatt ut mark til kjemisk analyse med jevne mellomrom etter at *Nereis virens* hadde vært eksponert for sedimentet i minimum 2 måneder.

Markene i første eksponeringsrunde ble tilsatt sedimentet 14/7-2006 og ble værende i sedimentet fram til 13-14/11-2006. På disse novemberdagene ble marken plukket ut fra sedimentet og frosset i individuelle poser ved -20°C. Antall overlevende mark i forhold til tilsatt antall ble notert. Det ble observert at overlevelsen var noe lavere i bølter som i utgangspunktet hadde blitt tilsatt mange mark, særlig der hvor det var fra 30 stykker og flere.

Markene i andre eksponeringsrunde ble tilsatt bølter med sediment den 22/11-2006 og var minimum eksponert for sedimentet frem til 26/1-2007. Det vil si at de var eksponert for sedimentet i minst 2 måneder. Markene i andre eksponeringsrunde ble værende i sedimentet fram til de ble fôret til torsk i løpet av forsøket. Den 14/5-2007 ble alle bølter med levende mark tømt og etter dette fikk torsken servert frossen mark fra første runde med markeksponering. Med unntak av 5 dager ble torsken derfor altså fôret med mark fra andre runde med markeksponering. Av praktiske årsaker ble det enkelte dager laget porsjonspakninger med mark fra andre runde med markeksponering. Markene i disse pakningene ble veid før de ble lagt på fryseren på -20°C. Markene ble holdt i frossen tilstand frem til de ble fôret til fiskene, slik at børstemarkene var så intakte og ferske som mulig da de ble gitt til fiskene.

All torsken i fôringsforsøket veide mellom 60 og 104 gram. En uke før dag 0, før at fiskene skulle rekke å akklimatisere seg, ble torskene flyttet til individuelle rom i 35 x 35 x 70 cm store akvarier. Akvariene var delt inn i tre rom, som var atskilt ved hjelp av skillevegger. Det ble tilført én fisk i hvert av rommene. Skilleveggene var dekket med hull på ca 0,5 cm i diameter slik at vann fritt kunne passere mellom de ulike rommene. Det var kontinuerlig vann- og lufttilførsel til alle akvariene.

Vanngjennomstrømningen var på ca 1 liter i minuttet. Det ble også plassert skillevegger mellom de ulike akvariene, slik at fiskene ikke skulle se hverandre og bli stresset (figur 7). Vannet til både *Nereis virens* og torsken kom fra 60 meters dyp utenfor Solbergstrand forskningsstasjon og hadde gjennomsnittlig temperatur på 7,1°C med en variasjon mellom 6,1 og 8,7°C. Saliniteten var gjennomsnittlig på 34,7 med variasjon mellom 34,2 og 34,9.



Figur 7 Fôringsforsøket. Fisk i akvarier til høyre, børstemark i enten sediment fra indre eller ytre Oslofjord til venstre. Foto: Anders Ruus

Til sammen var det 54 fisk fordelt på 18 akvarier. Fiskene var delt i to grupper med 21 i hver. I tillegg hadde hver gruppe 6 ekstrarisk. Den ene gruppen av torsk ble eksponert for sedimentbundne miljøgifter gjennom føden, ved at de ble fôret med børstemarken eksponert for sedimentet fra indre Oslofjord. Kontrollgruppen av torsk ble fôret med børstemark som hadde gått i sediment fra ytre Oslofjord.

Fiskene ble fôret to ganger i uka, henholdsvis på mandager og torsdager. Én bølge med kontrollmark og én bølge med eksponert mark ble tømt ved hver fôring. Sedimentet ble ført tilbake i bøttene og satt til side for kloring. Det ble veid ut ca 4-6 gram mark til hver fisk. Markene ble delt opp i biter da det viste seg at de hadde en tendens til å rømme, mellom akvariene via hullene i veggene, dersom de var intakte. Det viste seg også at det var lettere å få torskene til å spise marken dersom den var kuttet i biter. Markene ble fôret til torskene ved at de ble sluppet ned til hver enkelt fisk. Fordi torskene hadde individuelle rom i akvariene, var det lett å holde kontroll på hvilken torsk som spiste hva. Marken var, med unntak av de dagene den ble fôret med frossen mark, fortsatt i levende, eller i det minste i bevegelse, da den ble gitt til torken. De første ukene var det ikke alle fiskene som viste interesse for å spise børstemark, men generelt krevdes det bare ett til to forsøk før samtlige torsk spiste.

Før første fôring hadde torskene fastet i 4 dager slik at det skulle være lettere å lære dem å spise børstemark.

Særlig i begynnelsen av forsøket, da det fremdeles var noe usikkerhet rundt overlevelsen til børstemarkene i andre eksponeringsrunde, fikk de minste fiskene noe mindre mark enn de største. Etter hvert som det viste seg at børstemarkene klarte seg svært godt, ble man noe mer sjenerøs med porsjonene, men det ble gitt maks 6 gram mark til hver fisk per fôring. Det ble passet på at fiskene alltid ble fôret med minimum 8% av kroppsvekten sin i uka.

2.5 Prøvetakning

Fiskene både fra fôringsforsøket og oppvirvlingsforsøket ble prøvetatt ved dag 0, 13, 26, 39, 52, 66, 97 og 129. Ved hver prøvetakning ble det tatt én fisk fra hvert kar i oppvirvlingsforsøket. Det vil si at 3 kontrollfisk og 3 eksponerte fisk ble prøvetatt ved hver runde. I fôringsforsøket ble det samme antallet fisk prøvetatt, 3 kontrollfisk og 3 eksponerte fisk.

Ved dag 66 og dag 129 i oppvirvlingsforsøket ble det tatt prøver av 2 fisk fra hvert kar. Det ble ikke tatt prøver av noen ekstra fisk ved dag 66 i foringsforsøket, men ved dag 129 ble alle de 17 resterende fiskene prøvetatt (én fisk ble syk og døde i løpet av forsøket). Ved dag 0 ble det tatt prøver av 6 fisk i oppvirvlingsforsøket og 8 i fôringsforsøket. Disse fiskene ble aldri eksponert for noe form for sediment eller fôret med børstemark. All fisk ble avlivet med et slag i hodet. Fisken døde momentant og ble ved hver prøvetakning, i begge forsøkene, direkte veid og lengdemålt.

I oppvirvlingsforsøket ble det kun tatt prøver av galle og lever. Her ble vekten på fiskens lever notert og leveren ble overført prøveglass for kjemisk analyse. Før leveren ble fjernet fra fisken ble det, ved hjelp av sprøyte, tatt prøver av gallevæsken. Det ble påsett at gallevæske ikke ble sølt på leveren da stoffer i gallevæsken kan ha potensial til å hemme aktiviteten til CYP1A (cytokrom P4501A). Gallevæsken ble lagret på eppendorfrør og direkte frosset på flytende nitrogen. Dersom det var mulig å

fastsette kjønn, ble dette også gjort i oppvirlingsforsøket, men fiskene i begge forsøkene var juvenile.

I fôringsforsøket var hver prøvetaking mer omfattende da det ved hvert tidspunkt ble tatt prøver til biomarkøranalyse. Dette innebar at det ble tatt blodprøve og ekstra prøver fra lever i tillegg til prøvene som ble tatt under oppvirlingsforsøket. For bruk til biomarkøranalyse av zona radiataproteinet og vitellogenin ble det, direkte etter at fisken var avlivet, veid og målt, tatt en blodprøve fra torskens kaudalvene. Dette ble gjort ved hjelp av sprøyter dekket innvendig av heparin og aprotinin (fra Sigma, se adresser). Prøven ble tatt like ved analfinnen. Nålen ble stukket ned til fiskens ryggrad og så trukket litt tilbake. Det ble tappet så rikelig med blod som mulig og blodet ble deretter overført eppendorfrør og satt på is. Etter kort lagring på is, for å fullføre øvrig prøvetakning, ble blodet spunnet i en bordsentrifuge i cirka 5 minutter, slik at blodceller ble skilt ut fra plasma. Plasmaet ble overført egne cryo-rør ved hjelp av pasteur-pipetter. Både celler og plasma ble deretter frosset direkte på flytende nitrogen. Det ble laget små hull i eppendorfrørene før de ble frosset, slik at rørene ikke åpnet seg under nedfrysningen.

For biomarkøranalyse av CYP1A og EROD (7-etoksyresorufin *O*-deethylase) ble det, fra fiskenes lever, tatt et snitt på 0,5-2 gram, der hvor de store blodårene går inn. Ved bruk av lever-mikrosomer for biomarkøranalyse (EROD) anbefales det å alltid bruke samme området av fiskenes lever slik at resultatene best kan sammenliknes (Anulacion et al., 1997). Dette er fordi den enzymatiske aktiviteten i leveren potensielt kan være ujevnt fordelt. Leverprøvene ble overført cryo-rør. Levervevet som skulle benyttes til biomarkøranalyser ble frosset direkte på flytende nitrogen. Resten av leveren, som skulle til kjemisk analyse, ble overført glass med lokk og satt til frysing ved -20°C slik som i oppvirlingsforsøket. Vekten på leveren ble notert før prøve til biomarkøranalyse ble tatt. Galleprøver til analyse av PAH-metabolitter ble i fôringsforsøket tatt ved hver prøvetakning, slik som i oppvirlingsforsøket.

Alle prøvene, som ble frosset på flytende nitrogen, ble i fortsatt frossen tilstand overført tørris for å fraktes til fryser med temperatur på -80°C. Oppholdet på tørris

varte omkring en time.

2.6 Måling av PAH-metabolitter

PAH-er og mange av deres metabolitter fluorescerer både karakteristisk og kraftig (Aas et al., 1998). Dette gjør at det er mulig å måle innholdet av PAH-metabolitter i gallevæske på en forholdsvis enkel måte, ved hjelp av fast fluorescensdeteksjon (fixed fluorescence detection). Prinsippet bak metoden med fast fluorescensdeteksjon er at PAH-metabolittens struktur avgjør innenfor hvilken bølgelengde metabolitten fluoriserer. Bølgelengdene hvor et PAH-molekyl kan bli stimulert og bølgelengdene hvor det stråler ut, er karakteristisk for det bestemte stoffet (Ariese et al., 2005). Derfor kan fluorescens brukes til identifisering av ulike PAH-metabolitter (Lin et al., 1996) og dermed gi en indikasjon på hvilke PAH-er fisk har blitt eksponert for.

Av utstyr for denne analysen ble det brukt: Pipetter, QS 10.00 mm krystallkyvetter (kvarts, se adresser i vedlegg), plastikkyvetter av typen Plastibrand® 1,5 ml semimicro (se adresser i vedlegg), absorbansemåleren Beckham DU®-65 Spectrophotometer (se adresser i vedlegg), fluorosensmåleren Perkin-Elmer LS-5 Luminescence Spectrometer (se adresser i vedlegg) og parafilm. Det ble også benyttet rektifisert etanol, metanol, toluen, destillert vann og standarder av 2-OH-naftalen, 1-OH-fenantren, og 1-OH-pyren. Alle kjemikalier var fra Sigma, med mindre annet er nevnt.

Standardene i forsøket var i første runde fortynnet i metanol (Lin et al., 1996). 2-OH-naftalen hadde en konsentrasjon på 2112 ng/ml, 1-OH-fenantren på 2160 ng/ml og 1-OH-pyren på 2006 ng/ml. Da målingen av PAH-metabolitter foregikk i to etapper, ble det nødvendig å lage nye standarder til den andre målerunden. Standardene som ble laget ved andre runde ble fortynnet i toluen i stedet for metanol og det var kun 1-OH-pyren som hadde samme konsentrasjon som ved første runde. 1-OH-fenantren hadde ved andre runde en konsentrasjon på 2700 ng/ml og 2-OH-naftalen hadde en konsentrasjon på 2640 ng/ml.

Generelt holdt alle væsker romtemperatur under hele analysen. PAH-er er, som analysen forutsetter, lysfølsomme (Ariese et al., 2005) og det var derfor essensielt å forsøke å holde galleprøver og standarder mest mulig i mørket gjennom hele analysen. Det var også nødvendig å være påpasselig med å holde utstyret rent og vaske kvartskyvettene grundig for hver måling i etanol og destillert vann. Dette var for å unngå at forurensninger skulle påvirke resultatet.

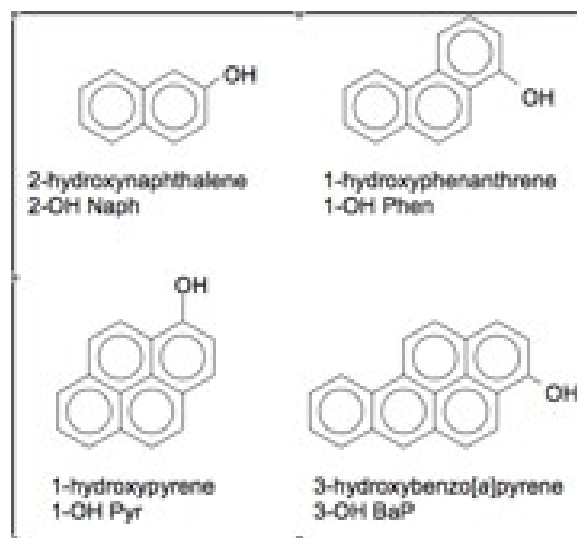
Galleprøvene ble blandet godt for hånd ved hjelp av parafilm i hvert av fortynningsstegene. Etter blanding ble 10 µl gallevæske, eller 100 µl der hvor det var mulig, fortynnet fortrinnsvis 100 eller 10 ganger. Fortynningsløsningen bestod av en blanding av 50% destillert vann og 50% rektifisert etanol (50/50). Det er anbefalt å blande prøvene i metanol og vann, men etanol er også brukbart (Ariese et al., 2005). Den fortynnede prøven ble overført engangs plastkyvetter for måling av absorbans. Av mangel på plastkyvetter ble av og til de samme kyvettene brukt om igjen. Disse ble da vasket grundig i såpevann og skylt svært godt i etanol og til slutt destillert vann.

Absorbansinstrumentet ble kalibrert for en blank prøve (50/50) ved hver måling. Prøvene måtte fortynnes opp til minimum 1000 µl fordi kyvettene, som var tilgjengelige for absorbansmåling, krevde minimum dette volumet. Det vil si at prøvene ble fortynnet enten 1:10 eller 1:100 før absorbansen ble målt. Absorbansen ble målt ved 380 nm (Doumas et al., 1987). Minimum galle for måling av absorbans ved 380 nm er 10 µl (Aas et al., 2000). Fisk som hadde avgitt mindre galle enn dette ble derfor utelukket fra denne analysen i sin helhet.

Etter at absorbansen var målt ble prøvene fortynnet ytterligere slik at forholdet gallevæske og 50/50 nå var 1:2000. Når prøvene fortynnes 1500-2000 ganger er dette normalt tilstrekkelig for å unngå problemet med den såkalte indre filtereffekten ("inner filter effect") (Aas et al., 2000). Denne effekten går ut på at andre stoffer enn PAH-metabolitter absorberer lyset som sendes inn i prøven under måling (Ariese et al., 2005). De ytterligere fortynnede prøvene ble overført kvartskyvetter. Før måling av fluorescensen til standarder og prøver, ble fluorescensapparatet nullet ut i forhold

til blank prøve. Blank prøve bestod av kun 50/50. Denne utlikningen ble gjort hver gang en ny prøve ble målt ved hver enkelt bølgelenge (med mindre to eller tre prøver ble målt samtidig på samme bølgelengde).

Fluorescens ble målt ved både eksitasjon og emisjon og ved følgende bølgelengder: 290-335 nm, 341-383 nm og 380-430 nm. Bølgelengdene ble valgt etter anbefaling fra Ariese et al (2005). 290-335 nm skal dekke fluorscensområdene til naftalen, og det to andre bølgelengdeparene områdene til henholdsvis pyren og benzo(a)pyren (Aas et al., 2000). I tillegg til disse bølgelengdene ble det også målt ved 256-380 nm for kvantifisering av fenantrenmetabolitter (pers. kom. Hylland, 2007). Generelt øker den optiske eksitasjonslengden jo større PAH-molekylet er (Vo-Dihn, 1978) (figur 8). Bredden på emisjonen ble satt til 5 nm og eksitasjonen på 2,5 nm. Verdien for prøvene ble avlest ved hver bølgelengde og notert.



Figur 8 Strukturen til PAH-metabolitter målt ved hjelp av fast flouescensdeteksjon (Ariese et al., 2005).

Standardene ble fortynnet 1:10 i 50/50. For hver dag med analyse ble det alltid startet med en måling av fluorescensen til standardene. Standardverdiene ble også målt igjen for hver 10. målte prøve. På denne måten kunne det kontrolleres at standardene forholdt seg forholdsvis stabile, og at resultatene for galleprøvene dermed var sammenliknbare.

Matinntaket hos fisk måles ofte som konsentrasjonen av pigmentet biliverdin i fiskenes galle. Biliverdin gir et bilde på den totale konsentrasjonen av gallevæsken. I fôringsforsøket var det mulig å holde god kontroll på hvor mye hver fisk spiste og fiskene spiste omtrent like mye hver. Den samme kontrollen på matinntaket var ikke mulig å ha i sedimentforsøket hvor noen fisk kan ha spist mer enn andre. På tross av dette ble det ikke valgt å normalisere fluorescensmålingene for absorbanse (konsentrasjonen av gallevæske), i noen av forsøkene, før de statistiske analysene startet. I de fleste forsøk hvor man har prøvd å korrigere for matinntaket har man ikke kunnet oppnå et lavere standardavvik (Ariese et al., 2005). Korreksjon for matinntak har derfor i de fleste tilfeller kun utgjort en ekstra usikkerhetsfaktor.

2.7 Opparbeiding av lever

I hovedsak er CYP1A-enzymet lokalisert i membranen til endoplasmisk retikulum (Celandier og Förlin, 1991; Whyte et al., 2000). Bakgrunnen for opparbeiding av lever er at man ønsker å skille ut mikrosomer i endoplasmisk retikulum og cytosol i fiskenes leverceller, slik at disse elementene kan brukes til analyse av biomarkører. Mikrosomer brukes blant annet til analyse av EROD-aktivitet (7-etoksyresorufin O-deethylase) for å fastsette innholdet av CYP1A i en prøve. Leverprøvene ble opparbeidet etter metoden beskrevet av Dingham og Murray (1990).

Homogeniseringsbuffer ble laget av fosfatbuffer fra stamløsninger av 0,1 M kaliumfosfat (KH_2PO_4) som er monobasisk og vannfri, og 0,1 M kaliumfosfat ($\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) som er en dibasisk trihydrat. Deretter ble det tilsatt 0,15 M kaliumklorid (KCl) til fosfatløsningen i tillegg til 1mM dithiotreitol (DTT). Alle kjemikaliene til analysen var fra Sigma.

Til cytosolbufferen ble det tilsatt 5% glycerol (99,5%). Cytosolbufferen hadde en pH på 7,73. Til mikrosomalbufferen ble det tilsatt 20% glyserol (99,5%) i tillegg til vannfri etylendiamintetraeddiksyre (EDTA). Generelt for opparbeidingen var det essensielt at prøvene ble holdt på is under hele prosessen og ikke nådde temperaturer

over 4°C. Dette var for at enzymatisk aktivitet ikke skulle gå tapt (Burke og Mayer, 1974).

Hver leverprøve ble veid opp mens den fortsatt var tilnærmet frossen og deretter overført homogeniseringsrør. Der det var tilstrekkelig med prøve ble ca ett gram lever veid ut. Cytosolbuffer ble så tilsatt slik at leverprøven og cytosolbufferen målte 5 ml til sammen. Dersom leveren veide under 0,45 g ble det kun tilsatt såpass med cytosolbuffer at cytosolbufferen og lever målte 2,5 ml til sammen. Leveren med cytosolbuffer ble så homogenisert ved hjelp av en teflonpistill festet i en motorisert homogenisator ved 1000-1400 rpm ("rounds per minute"). Ved at teflonpistillen ble senket opp og ned 10 ganger i leverprøvene ble cellene i prøvene knust.

Homogeniseringsrørene ble hele tiden holdt på is, også under selve knusingen.

Etter at levercellene var knust og homogenisert/resuspendert, ble blandingen overført til sentrifugerør og sentrifugert på 4°C i en Haereus (se adresser i vedlegg) bordsentrifuge 517 i 30 minutter ved 10.000 x g. Denne sentrifugeringen sørget for at ikke-homogenisert vev, som blod og cellerester, ble skilt ut som pellets på bunnen av sentrifugerøret, og at fett la seg på toppen. Supernatanten mellom disse to lagene inneholdt den mikrosomale og cytosoliske fraksjonen. Denne væsken ble suget opp ved hjelp pasteurpipetter og overført til nye sentrifugerør. Supernatanten ble så sentrifugert i 2 timer ved 20.000 x g på 4°C i en Heraeus sepatech og sorvall rc 6-sentrifuge.

Supernatanten etter den andre sentrifugeringen kalles cytosol (Dignam og Murray, 1990). Pelleten i samme preparatet kalles mikrosomalfraksjonen (Whyte et al., 2000) og inneholdt i hovedsak membraner og endoplasmatisk retikulum. Andre organeller i tillegg til cellekjerner ble fjernet ved den første sentrifugeringen.

Supernatanten fra den andre sentrifugeringen ble fjernet forsiktig slik at kun mikrosomalfraksjonen ble værende igjen i sentrifugerørene. Det ble tilsatt 1,5 ml mikrosomalbuffer til mikrosomalfraksjonene og blandingene ble homogenisert ved hjelp av den samme motoriserte homogenisatoren som ble brukt ved første steg i

prosessen. Mikrosomalfraksjonene med buffer ble ført opp og ned i teflonpistillen 5 ganger. Løsningene ble etter homogenisering overført til 3-4, 6 ml eppendorfrør hvor av 3 var forholdsvis fulle og ett av dem kun inneholdt cirka 2 ml. Rørene ble så frosset på -80°C . Mikromalfraksjonene ble lagret i ca 2 måneder på -80°C før de ble brukt til de ulike analysene. Anulacion et al. (1997) observerte intet tap i CYP1A-aktiviteten i mikrosomalfraksjoner, som ble lagret i inntil 5 måneder ved -80°C . Når prøvene skulle tines for analysering, ble dette konsekvent gjort på is og prøvene ble holdt på is helt fram til analysen var ferdig.

2.8 Biomarkøranalyser

Alle kjemikalier til analyser av biomarkører var fra Sigma, med mindre annet er nevnt. Alle antistoff var fra Biosense (se adresser i vedlegg), med mindre annet er nevnt .

2.8.1 Kvantifisering av vitellogenin ved hjelp av ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)

Induksjon av vitellogenin kan benyttes som biomarkør for å undersøke om fisk har vært utsatt for østrogenliknende kjemikalier (Hylland og Haux, 1997; Van Veld et al., 2005). Målet med denne analysen var å finne innholdet av vitellogenin i blodplasma. Ved hjelp av kompetitiv indirekte ELISA, ble det kvantitativt målt hvor stort innhold den enkelte fisken hadde av vitellogenin blodplasma. Metoden var en modifikasjon av den presentert av Hylland og Haux (1997).

Prinsippet bak denne analysen er at et antistoff for vitellogenin tilsatt plasmaløsning, vil binde seg til vitellogenin i den samme løsningen (Tyler et al., 1999). Dette vil skje i konkurranse med en kjent mengde vitellogenin som er bundet opp i plateveggene i en mikrotiterplate. Et enzymkonjugert sekundært antistoff blir siden tilsatt. Dette sekundære antistoffet binder seg til det primære antistoffet, som har festet seg til vitellogeninet, på veggene og i bunnen av mikrotiterplata (Wheeler et al., 2005). Når

substrat tilsettes, vil enzymkonjugatet utvikle en farge. Ved avlesning av endepunktet for denne fargeutviklingen kan en beregne konsentrasjonen av vitellogenin i prøven. Dette gjøres ved at verdien for prøven sammenliknes med en standardkurve (Tyler et al., 1999).

Av laboratorieutstyr til ELISA ble det brukt pipetter (0,5-10 µl, 10-50 µl, 50-200 µl og 200-1000 µl), multikanalpipetter med 12 kanaler (10-50 µl og 50-300 µl), eppendorfrør (1.5 ml), 96-brønns mikrotiterplater for høy protein absorpsjon med flat bunn og tilhørende plateforseglere (NUNC A/S var leverandør av alle mikrotiterplater til alle analyser, se adresser i vedlegg). Til fortynning ble det benyttet plastreservoarer samt en vortexer til blanding av prøvene ved fortynning og før de ble tilsatt mikrotiterplatene.

I tillegg krevde analysen platevasker (Skanwasher 300 versjon A, Skatron (se adresser i vedlegg)), plateleser (Thermomax microplate reader, Molecular Devices (se adresser i vedlegg)) og PC med SoftMax Pro-program. For å gjennomføre analysen var flere ulike reagenser nødvendige, det være seg; karbonat-bikarbonat bufferkapsler, Trizma HCl, Trizma base, Natriumklorid (NaCl), Tween-20, BSA, (Albumin, Bovine), Svovelsyre (H₂SO₄) og TMB-plussubstrat (Bio-Rad, se adresser i vedlegg). Som primært antistoff ble det brukt anti-torsk Vg antiserum "Julia" (intern reagens fra Norsk institutt for vannforskning) og som sekundært antistoff HRP-konjugert geit anti-kanin IgG (GAR-HRP, AmDEX AX01-0301X). Referanseprøven var 100 ng/ml rensset vitellogenin. Standardprøven bestod av plasma fra østrogenbehandlet torsk "Gm Vg 0699", 44 mg/ml antigen, vitellogenin (intern standard fra Norsk institutt for vannforskning).

Analysen krevde også flere ulike løsninger. Grunningsbuffer (coatingbuffer) ble laget ved å tilsette 1 kapsel karbonat-bikarbonatbuffer per 100 ml dH₂O. Dette ga tilnærmet en 1:100-løsning. For å lage 10 liter TTBS med 0.05% Tween-20, pH 8,7 ble det brukt: 17,4g Trizma base 8,8g Trizma HCl, 292,4g NaCl i 10L dH₂O og tilsatte 5 ml Tween-20. Løsningen ble blandet godt fordi Tween er tungt løselig. Det ble laget blokkeringsløsning ved å tilsette 1% BSA til TTBS. Fortynningsløsningen

bestod av 0,1% BSA i TTBS og som ble det brukt 1 M H₂SO₄. Det primære antistoffet ble fortynnet 1:20.000 ganger i fortynningsløsning og det sekundære antistoffet fortynnet vi 1:10.000 ganger i fortynningsløsning. Antistoffene ble fortynnet samme dag de skulle brukes. Fargesubstratløsningen TMB-plus var ferdig til bruk, men måtte oppnå romtemperatur og stå mørkt før og under bruk. Dersom TMB-plus ble utsatt for lys begynte løsningen å utvikle farge før den ble tilsatt prøvene. Det ville da være vanskelig å forholde seg fortrolig til resultatene fra plateavlesningen. Disse forholdene rundt TMB-plus, gjaldt for alle analyser hvor TMB-plus ble brukt.

100 µl standardprøve fortynnet til 50 ng/ml i grunningsbuffer ble tilsatt alle mikrotiterbrønner unntatt A1-D1. 100 µl grunningsbuffer ble deretter tilsatt brønn A1-D1. Mikrotiterplatene ble dekket med plateforseglingstape og innkubert i kjøleskap på 4°C over natten. Det var viktig å passe på at alle platene stod vannrett i kjøleskapet, slik at grunningslaget ble jevnt fordelt. Dagen etter ble blodplasmaprøvene fortynnet både 1:50 og 1:5000 i fortynningsløsning. Både før fortynningen startet og i hvert fortynningssteg, ble prøvene blandet grundig ved hjelp av en vortexer. Alt arbeid med prøver, antistoff og standarder foregikk på is. Vitellogenin er stabilt lenge når det lagres i plasma, men degraderes raskt under opprensing (Hylland et al., 2006). En standardrekke ble laget samme dag den skulle brukes. Konsentrasjonene på standardene var på: 0-0,0,45-1,37-4,1-12,3-37-111-333-1000-3000 ng/ml. Standardene var fortynnet i fortynningsløsning. Platene som hadde stått over natten ble vasket med TTBS 3 ganger (2 x 10 sekunder +1 x 1.0 minutter). På platevaskeren tilsvarte dette program nr 1, A;3WA. Før platevaskeren ble tatt i bruk ble den alltid rensset med destillert vann og primet for TTBS. Dette gjelder for alle analysene hvor platevasker ble brukt. Direkte etter at platene var ferdig vasket, ble 300 µl blokkeringsløsning tilsatt alle brønnene. Platene inkuberte så i 30 minutter ved romtemperatur. Blokkering blir utført for å unngå bakgrunnsstøy (Tyler et al., 1999).

Etter inkubering ble platene vasket igjen, 3 ganger i TTBS. Prøver, standarder og blanke prøver ble deretter fordelt på platene. Fortynningsløsning alene utgjorde blank prøve. 100 µl av denne ble tilsatt i brønn A1-B1 og 50 µl i brønn C1-D1. Brønn C1-D1 var området for undersøkelse av uspesifikk binding. 50 µl av de fortynnede standardprøvene ble pipettert ut i brønnene E1-H2, to brønner per fortynning. Deretter ble 50 µl av prøve 1, 1:50-fortynning, tilført i brønn A3 til D3 og 50 µl av 1:5000-fortynningen av samme prøve tilsatt brønn E3-H3. Prøve 2, 1:50-fortynning, ble tilsatt brønn A4-D4 og 1:5000-fortynningen ble til satt brønn E4-H4 også videre. Av det fortynnede primære antistoffet ble 50 µl tilsatt alle brønner unntatt A1-B1. Etter tilsetning av det primære antistoffet inkuberte alle platene i kjøleskap på 4°C over natten. Den kommende dagen ble platene igjen vasket med TTBS 3 ganger. Fortløpende etter at platene var vasket ble det sekundære antistoffet tilsatt, 100 µl i alle brønner, med unntak av i A1 og B1. I brønn A1 og B1 ble det tilført 100 µl TTBS med 0,1% BSA. Platene ble deretter forseglet og inkubert i kjøleskap ved 4°C i 6-8 timer. Tidspunkt for inkuberingsstart ble notert. Etter inkubering ble alle platene vasket 5 ganger (4 x 0,5 minutter + 1x 1,5 minutter) i TTBS (program 5# og 6#: A;4WA+ 1WA) Direkte etter vask, ble det tilsatt 100 µl TMB-plus i alle brønner. Platene inkuberte mørkt i cirka 10-15 minutter. Reaksjonen ble stoppet ved å tilsette 50 µl stoppløsning i alle brønnene. Etter stopp ble absorbansen målt ved 450 nm i plateleseren. Avlesning skjedde innen 1 time etter at fargereaksjonen ble stanset. Etter dette begynner prøvene å degenereres. Det dannes lett utfelling i brønner med kraftig fargeutvikling, så brønnene bør helst avleses så raskt som mulig. Dataene fra plateavlesningen ble bearbeidet i SoftMax Pro og Excel.

2.8.2 Zona radiataproteinet, ELISA

Prinsippet for denne metoden er å bruke kunnskapen om antistoffers binding til tilhørende proteiner, til å måle bindingen av antistoffer til zona radiataproteinet i en prøve. Slik kan man fastslå innholdet av zona radiataproteinet i blodplasma fra fisk, og på den måten si noe om eksponeringen for hormonpåvirkende stoffer (Arukwe og Goksøyr, 2003; Beyer et al., 2001). Målingene i denne metoden var relative og det

ble ikke brukt standard. Som referanse, og dermed sammenlikningsgrunnlag for ulike plater, ble det brukt internstandard fra Norsk institutt for vannforskning. Denne bestod av plasma fra østrogenbehandlet torsk (Gm Vg 0699, 44 mg/ml).

For å gjennomføre denne metoden ble det brukt samme plateleser, platevasker, pipetter, multipipetter, datamaskin, mikrotiterplater og platereservoarer som i vitellogeninanalysen. Analysen krevde også flere ulike løsninger. I all vesentlighet var løsningene de samme som under analysen av vitellogenin. Både grunningsbuffer og TTBS ble laget etter samme fremgangsmåte, blokkeringsløsning og fortynningsløsning likeså. Det ble også benyttet samme TMB for fargefremkalling, og 1 M H₂SO₄ som stoppløsning. Som primært antistoff ble det benyttet kanin anti-laks zrp (O-146) og som sekundært antistoff geit anti-kanin IgG konjugert med HRP (GAR-HRP). I denne analysen ble mikrotiterplatene grunnet med selve blodplasmaprøven. Prøvene var tint en gang tidligere for analyse av vitellogenin. Alle prøvene ble blandet godt på vortexer før fortynningen startet. Vortexeren ble også benyttet for hvert steg i fortynningsprosessen. Pipetteringen i forsøket foregikk alltid mot bunnen av brønnene på mikrotiterplatene, uten å skrape i bunnen. Plasmaprøvene ble fortynnet i platereservoarer 1:2000 i grunningsbuffer. 100 µl ble pipettert ut i brønnene A1-D1. Dette var området for blanke prøver. Referanseprøve ble fortynnet 1:4000 og pipettert ut i brønnene E12-H12. Av de fortynnede prøvene ble det pipettert ut i 4 brønner for hver prøve. Prøve 1 kom i brønn E1-H1, prøve 2 i brønn A2-D2 og så videre. Etter at alle prøvene var pipettert ut ble mikrotiterplatene dekket med tape satt til inkubering i kjøleskap over natten ved 4°C. Dagen etter ble alle platene vasket 3 ganger i platevasker med TTBS. Etter vask ble det direkte tilsatt 300 µl blokkeringsløsning til alle brønnene. Platene ble så satt til inkubering i 30-60 minutter. Etter inkuberingen ble platene vasket med samme program som tidligere på dagen. Fortløpende ble det så tilsatt 100 µl primært antistoff i alle brønner. Antistoffet var fortynnet 1:100 i fortynningsløsning. Etter tilsetning av primært antistoff ble prøvene inkubert over natten ved 4°C (med tape over). Etter å ha stått over natten ble platene igjen vasket 3 runder i platevasker med TTBS. Umiddelbart ble det tilsatt 100 µl sekundært antistoff. Antistoffet var denne gangen fortynnet

1:3000 i fortynningsbuffer. Etter tilsetning inkuberte prøvene i kjøleskap i 6-8 timer ved 4°C med tape over. Da inkuberingen var over ble mikrotiterplatene vasket 5 ganger med TTBS. Rett etter platene var vasket ble det tilsatt 100 µl TMB i alle brønnene og prøvene ble satt til inkubering i mørket. Prøvene reagerte raskt med fargeutvikling og prosessen ble derfor stoppet etter ca 10 minutter. For å stanse inkuberingen ble det tilsatt 50 µl stoppløsning. Absorbansen ble målt ved 450 nm i plateleser og dataene bearbeidet og lagret i SoftMax Pro og Excel.

Før statistisk analyse av dataene for ZRP ble gjennomsnittet per prøve beregnet. Denne verdien for hver prøve ble så delt med gjennomsnittsverdien for referanseprøven for samme plate som prøven var på. Deretter ble denne verdien ganget opp med gjennomsnittet for referansene på alle platene. På denne måten ble det justert for en unik plateverdi og sammenlikningsgrunnlaget mellom de enkelte prøvene ble forbedret.

På grunn av enkelte feil i noen av analysene måtte noen få data slettes før de statistiske analysene. Disse dataene utgjorde negative verdier og ble ikke regnet som reelle.

2.8.3 Analyse av protein

Hensikten med denne metoden, er å finne den totale mengden protein i et vevsekstrakt. Dette gjøres gjennom kvantifisering av et farget proteinkompleks i mikrosomalfraksjonen fra opparbeidet lever. Metoden er modifisert etter Lowry et al. (1951) og årsaken til at den utføres er nødvendigheten av å kunne standardisere analyser slik som CYP1A i forhold til proteininnholdet i en prøve.

Analysen har to steg basert på proteinreaksjoner med en løsning av alkalikobbartartrat, og en folinreagent. Fargeutviklingen som oppstår i analysen er primært forårsaket av aminosyrene tyrosin og tryptofan (Lowry et al., 1951). I mindre grad virker også cystin, cystein og histidin inn på denne. Det blå produktet fremkalt av reaksjonen, kan enkelt måles ved 750 nm (Lowry et al., 1951) i en plateavleser.

Proteinkonsentrasjonen i prøvene ble beregnet ved å bruke bovin gammaglobulin som standard (intern standard hos Norsk institutt for vannforskning).

Av løsninger krevde analysen 0,1 M trisbuffer med pH 8,0 ved 4°C, reagens A¹: Alkalikobbertartratløsning, reagens B¹: Fortynnet folinreagens og bovin gammaglobulin (1,45 mg/ml). Begge reagenser var fra Bio-Rad.

Utstyret som ble brukt var eppendorfrør, 96-brønns mikrotiterplater (vanlige, uten høy protein absorpsjon), pipetter på 20, 25 og 200 µl, platereservoarer til bruk ved benyttelse av mikrokanalpipetter, vortexer og plateleser innstilt på 750 nm som var tilknyttet datamaskin med Soft Max Pro. Det er også verdt å merke at det ble jobbet på is til enhver tid under denne analysen.

Som standard ble det laget 4 løsninger av bovin-gammaglobulin proteinstandard i trisbuffer.. Konsentrasjonen på 1,45 mg/ml ble beholdt som den høyeste for standardene og de øvrige ble laget ved å halvere tre ganger til konsentrasjoner på 0,725, 0,3625 og 0,18125. Standardene ble godt blandet ved hvert fortynningssteg.

Alle prøvene ble blandet godt og fortynnet 1:10 i trisbuffer. Fortynningsnivået var bestemt ut fra en standardisering, ved hjelp av en tilfeldig valgt prøve, gjort dagen før analysen startet. Det ble tilsatt 10 µl trisbuffer (blank) i brønn A1-A3 og de 4 standardene ble fordelt i brønnene A4-B7. Det var tre brønner med hver standard og 10 µl i hver brønn. De fortynnede prøvene ble så tilsatt, tre brønner per prøve med 10 µl i hver brønn. Etter at prøver, standarder og blank prøve var tilsatt, ble 25 µl av reagens A tilsatt i alle brønnene. Deretter ble 200 µl av reagens B tilsatt i hver brønn. Platen ble så blandet forsiktig for hånd i ca 1 minutt og deretter satt til inkubering i 15 minutter. Etter inkubering ble absorbansen avlest ved 750 nm. Dette skjedde innen én time etter at reagens B ble tilsatt. Ut fra absorbansmålingene av standardene, ble det laget en standardkurve ved hjelp av programmet SoftMax Pro.

Proteinkonsentrasjonen i prøvene beregnet fra den lineære delen av standardkurven.

2.8.4 CYP1A ELISA

I denne analysen er hensikten å måle bindingen av antistoffer for CYP1A til proteinet, og på den måten fastsette innholdet av CYP1A i en prøve. Analysen ble utført på mikrosomalfraksjon fra leveropparbeidingen på tilnærmet tilsvarende måte som Hylland et al. (2006). Målingene i denne analysen var relative og det ble ikke benyttet standard. Som referanse og sammenlikningsgrunnlag mellom de ulike prøvene ble det brukt en ordinære prøve, som ble tilført alle mikrotiterplatene.

Av utstyr krevdes det også til denne analysen samme plateleser, platevasker, pipetter og multipipetter som til analysene over. Mikrotiterplatene hadde høy proteinabsorpsjon. Det ble brukt platereservoarer til fortynning av prøvene. Av løsninger ble det brukt tilsvarende grunningsbuffer, stoppløsning, TTBS, blokkeringsløsning, fortynningsbuffer og fargebuffer (TMB) som i vitellogenin- og zona radiataanalysene. Som primært antistoff ble det benyttet anti-fisk CYP1A antistoff (CP226). Det finnes antistoff spesielt for torsk (NP-7), men anti-fisk CYP1A (CP226) fungerer best også på torsk (pers. kom. Hylland, 2007). Som sekundært antistoff ble det benyttet geit anti-kanin IgG-konjugert med HRP (GAR-HRP). Under hele analysen foregikk pipetteringen mot bunnen av brønnene av mikrotiterplatene. Alle brett ble forsøkt holdt så rett som mulig til enhver tid og platene ble så lite som mulig berørt på undersiden.

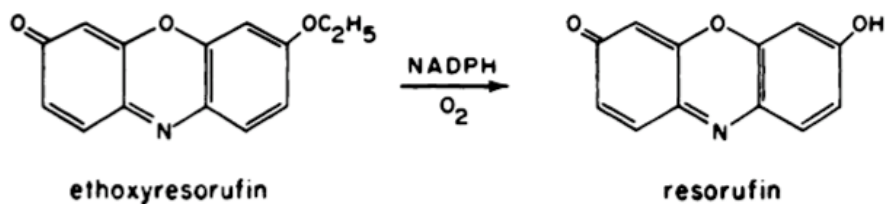
Med utgangspunkt i verdiene fra analysen av proteinnivået i mikrosomalfraksjonen, ble nye mikrosomalprøver fortynnet til 1 µg/ml i coatingbuffer. Av prøven som ble brukt referanse ble det laget ekstra mye fortynning da denne prøven skulle være gjennomgående på alle platene. Det ble pipetert ut 100 µl coatingbuffer på mikrotiterplatene i brønnene A1-D1. Dette var området for blanke prøver. 100 µl referanseprøve ble tilført brønnene E1-H1. Deretter ble 100 µl av prøve 1 tilsatt brønn A2-D2, 100 µl av prøve 2 i brønn E2-H2 og så videre. Platene ble overdekket med tape og satt i kjøleskap for inkubering over natten ved 4°C.

Den påfølgende dagen ble mikrotiterplatene vasket i platevasker 3 ganger med TTBS. Fortløpende ble så 300 µl blokkeringsløsning tilsatt og platene satt til inkubering i 30-60 minutter, hvorpå platene igjen ble vasket 3 ganger med TTBS. Etter vask ble det tilsatt 100 µl primært antistoff til alle brønner. Antistoffet var fortynnet 1:1500 i fortynningsbuffer. Opprinnelig var det ønskelig med en fortynning på 1:1000 (Hylland et al., 2006), men det ble oppdaget for sent at det var mangel på nok antistoff. Prøvene ble etter tilsetning av det primære antistoffet satt til inkubering i kjøleskap over natten ved 4°C. Platene var forseglet med tape.

Etter inkuberingen var overstått, ble platene igjen vasket i TTBS 3 ganger og det ble pipettert 100 µl sekundært antistoff i alle brønner. Antistoffet var denne gangen fortynnet 1:3000 i fortynningsbuffer. Prøvene inkuberte i 6-8 timer ved 4°C med tape over, og etter inkubering ble platene vasket 5 ganger med TTBS. Tilsetning av TMB ble foretatt direkte etter vask, 100 µl i hver brønn. Inkuberingen varte i ca 20 minutter før tilsetning av 50 µl stoppløsning til alle brønnene og avlesning av absorbansen på 450 nm. CYP1A-verdiene ble justert for referanser på samme måte som for ZRP, både for prøvens egen plate og platene imellom.

2.8.5 EROD (7-etoksyresorufin O-deetylase)

Denne metoden bygger på anbefalinger fra Burke og Mayer (1974) og Whyte et al. (2000). Analysens formål er å beregne induksjonen av CYP1A i mikrosomalfraksjonen fra opparbeidet lever, ved å bestemme den såkalte EROD-aktiviteten i en prøve. 7-etoksyresorufin blir tilført til isolert, mikrosomalt CYP1A og deretter måles prøvens fluorisering når CYP1A omdanner 7-etoksyresorufin til resorufin ved hjelp av NADPH (Nikotinamid-adenin-dinukleotidfosfat) (Burke og Mayer, 1974) (figur 9). Aktiviteten i hver av prøvene standardiseres ved hjelp av proteinmålingene beskrevet tidligere i dette kapittelet.



Figur 9 . Oksidativ dealkylering av 7-etoksyresorufin av CYP1A2 ved hjelp av NADPH (Burke og Mayer, 1974).

Etoksyresorufin og resorufin løst i vann (10 µg/ml), ble totalt degradert etter 2 timer i rom med skarpt lys som var utenfor stoffenes fluorescerende eksitasjonsbølgelengde (Burke og Mayer, 1974). Det var derfor svært viktig å arbeide med disse stoffene i dempet, gult lys under hele analysens gang.

Av utstyr til analysen trengtes plateleser til måling av fluorescens med 530 og 590 nm filtre, multipipette, pipetter, platereservoarer og 96-brønns mikrotiterplater (uten høy protein absorpsjon). Hansker ble brukt til enhver tid og ved behandling av DMSO, ble det brukt et ekstra par spesialhansker. Som buffer ble det brukt en kalium-fosfatbuffer med pH 8,0. Denne ble tillaget av to stamløsninger av K_2HPO_4 og KH_2PO_4 . Noen dager før utføring av analysen ble NADPH fortynnet i buffer til 50 mM. Fortynningen ble overført 0,5 ml eppendorfrør og frosset på $-80^{\circ}C$. Til reaksjonsblanding ble 7-etoksyresorufinen fortynnet til 0,2 mM i DMSO. For å kalibrere 7-etoksyresorufin-løsningen, ble absorbansen målt på denne fortynningen ved 450 nm. Resultatet ble 0,056 A. 0,75 ml av fortynningen per 50 ml buffer ble brukt som reaksjonsblandingen. 7-etoksyresorufinen ble hele tiden oppbevart mørkt. Etter tillagning av reaksjonsblanding, ble alle prøver fortynnet 5 ganger i buffer i platereservoarer. Arbeidet med prøvefortynningen foregikk hele tiden på is, og prøvene ble også tint på is. Enzymer degraderes lett ved temperaturer på over $-80^{\circ}C$ (Whyte et al., 2000) så det var viktig å holde prøvene så kaldt som mulig.

Som standard ble det benyttet 10 µM resorufin i DMSO. Standarden ble kalibrert ved måling av absorbans ved 572 nm ($\epsilon = 73.2 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Verdien ble avlest til 0,479 A. Standarden ble så fortynnet til 0, 0.01, 0.02, 0.04, 0.08, 0.16, 0.32 og 0,064 µM i

buffer. Etter tillagning av standarder ble disse pipettert ut i brønnene A1-B7, 300 μ l i hver brønn. Det var to brønner per standardfortynning.

Det neste steget i prosessen innebar å pipettere ut 200 μ l reaksjonsblanding i brønnene A8-B12 og i C1-H12. Deretter hadde ble 50 μ l buffer tilsatt brønnene A8-B12 og det samme volumet med fortynnet prøve i brønnene C1-H12. Det var 6 brønner per prøve og i brønnene F1-H12 ble det tilsatt 10 μ l 0.32 μ M resorufin-standard (spekking ("spike")). Til slutt, og så raskt som mulig, ble 25 μ l fortynnet NADPH-løsning (2.4 mM) tilsatt i brønnene A8-B12 og C1-H12. Direkte etter tilsetning av NADPH ble fluorescensen avlest i 8 steg (omtrent i 4 minutter). Dette ble gjort ved eksitasjon på 530 nm og emisjon på 590 nm. Etoksyresorufin og resorufin er begge svært fluorescerende, men området for maksimal fluorisering varierer (Burke og Mayer, 1974). Området for maksimums emisjon for resorufin ligger på 586 nm og på 560 nm for eksitasjon. Tilsvarende for etoksyresorufin er henholdsvis 570 og 456. Den 100 nm forskjellen i eksitasjonsmaksimum gjør at stoffene er lette å skille fra hverandre under fluorescensmåling. Maksimumsområdene til resorufin ligger også utenfor rekkevidden til aminosyrer som for eksempel tryptophan, som finnes i mikrosomene og også til NADPH (Burke og Mayer, 1974).

Før statistiske analyser ble de avleste resultatene korrigert i forhold til proteininnholdet og absorbanse. Det ble også justert for forandringer i blank prøve over tid, da det viste seg at denne hadde en synkende tendens. I de statistiske analysene benyttet vi kun avlesningene uten spekking.

2.9 Kjemiske analyser

Kjemiske analyser av børstemark, torskelever og sedimenter ble utført av Norsk institutt for vannforskning i henhold til deres interne prosedyrer. Det ble målt konsentrasjoner av PCB-28, 52, 101, 118, 153, 138 og 180 i lever og børstemark og PAH-er i børstemark. Disse 7 PCB-kongerene omtales som PCB-7. Analysens gang var som følger (Ruus og Green, 2005; Ruus et al., 2005): Materialet ble homogenisert

og internstandarder tilsatt. For det biologiske materialet ble forbindelsene deretter ekstrahert to ganger med sykloheksan og aceton (4:3) ved bruk av ultralyd. Denne prosessen foregikk i 3 minutter. Ekstraktene ble så vasket med 0,5% saltvann hvorpå ekstraksjonsvolumet ble redusert og igjen vasket med GPC. Deretter ble ekstraktene syrebehandlet med konsentrert svovelsyre og analysert med gasskromatografi med elektronaffinitetsdetektor (GC/ECD). Sedimentet ble tilsatt diklorometan og sykloheksan (1:1 vol/vol) før GC/ECD. De interne standardene ble benyttet til å kvantifisere de individuelle komponentene av PAH-er og PCB-er. Fettbestemmelsen var gravimetrisk. Deteksjonsgrensen for PCB var på 0,5 µg/kg og 2 µg/kg for PAH for alle analyser.

2.10 Statistiske analyser

For statistiske analyser ble statistikkprogrammet STATISTICA benyttet. Homogenitet av varians ble undersøkt ved en Levene-test (Levene et al., 1960). I de tilfellene hvor Levenes test viste seg å være signifikant ble testen gjort igjen på log₁₀-transformerte data. Enveis ANOVA (Fisher, 1953) ble utført i de tilfellene hvor Levenes test ikke ga signifikans (dvs at variansene ikke var signifikant ulike). Dersom en ANOVA viste signifikant resultat, ble det utført en Dunnett-test (Dunnett, 1955). Dunnett undersøker signifikansen for alle data mot ett tidspunkt (eller en kontroll), i dette tilfellet mot dag 0. I de tilfellene hvor Levenes test var signifikant også for log₁₀-transformerte data, ble det benyttet en ikke-parametrisk Kruskal-Wallis-test (Kruskal og Wallis, 1953). Dersom Kruskal-Wallis ga signifikans, ble det benyttet en posthoc multippel sammenlikning av gjennomsnittet for alle grupper (Siegel og Castellan, 1988). Ved sammenlikning av kontrollgruppen og den eksponerte gruppen ved de ulike tidspunktene for prøvetakning, ble det benyttet en t-test (Student, 1908). Dersom dataene ikke hadde homogen varians, ble det brukt en Mann-Whitney-U-test (Mann og Whitney, 1947). Alle signifikansnivåer ble satt til $p < 0,05$.

Boksploott ble valgt som grafisk fremstilling av resultatene. Boksene viser 15- og 85-persentiler og median, mens strekene (whiskers) viser minimums og maksimumsverdier. Der hvor det er få verdier og det ikke er noen streker vises kun minimums- og maksimumsverdier og median.

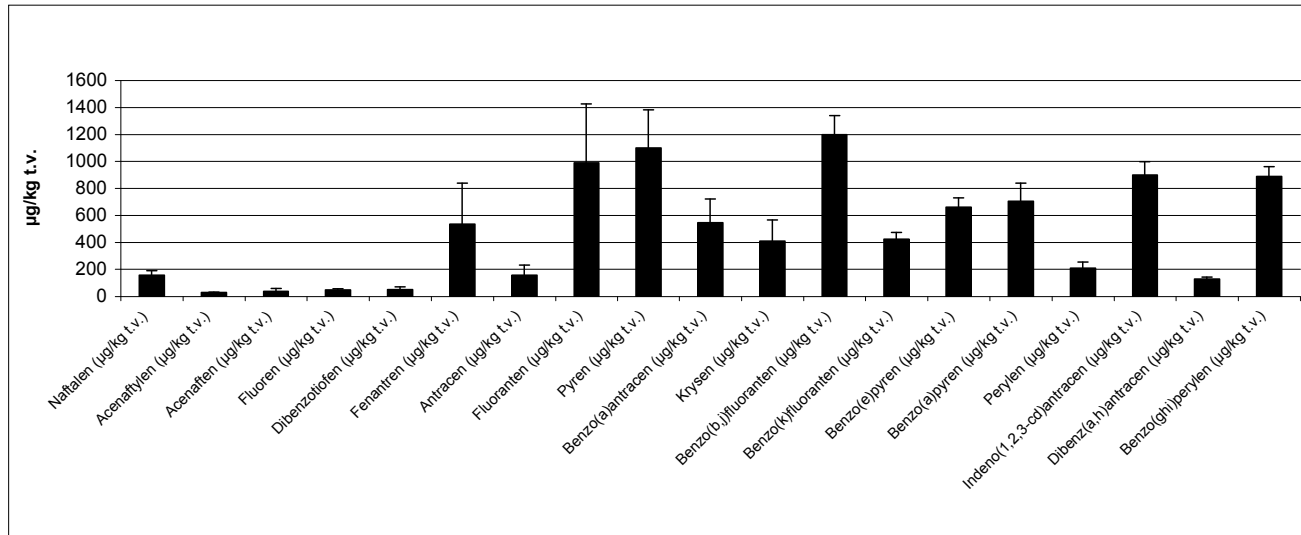
Enkelte av målingene av PAH-metabolitter hadde verdier på 0. Derfor ble det plussset på 1 til alle verdier før en eventuell log10-transformering ($\log x+1$ -transformering).

Fiskenes kondisjon ble beregnet på følgende måte i Excel: $(\text{vekt (g)} \cdot 100) / \text{lengde i cm}^3$ (se vedlegg for verdier).

3. Resultater

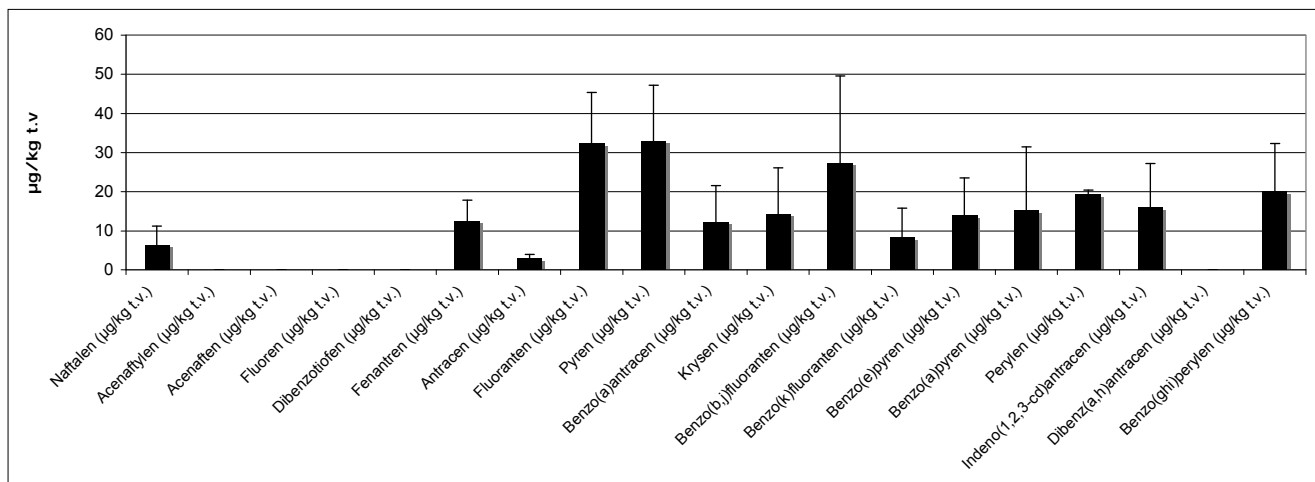
3.1 Kjemiske analyser av sedimenter

I sedimentet fra indre Oslofjord i fôringsforsøket var nivået av fenantren, pyren og benzo[a]pyren markert. Det var også høye verdier for andre PAH-er, som det ikke ble analysert for metabolitter av i fiskenes galle. Naftalen derimot så ikke ut til å utgjøre en betydelig andel av sedimentets totale innhold av PAH (figur 10). Ett av tre replikater av sediment, fra indre Oslofjord i fôringsforsøket, hadde markert høye verdier av PCB og PAH i forhold til de øvrige replikatene. Dette replikatet ble ikke antatt å reflektere det generelle eksponeringsbildet *Nereis virens* hadde blitt utsatt. Replikatet ble derfor utelatt fra de videre analysene.



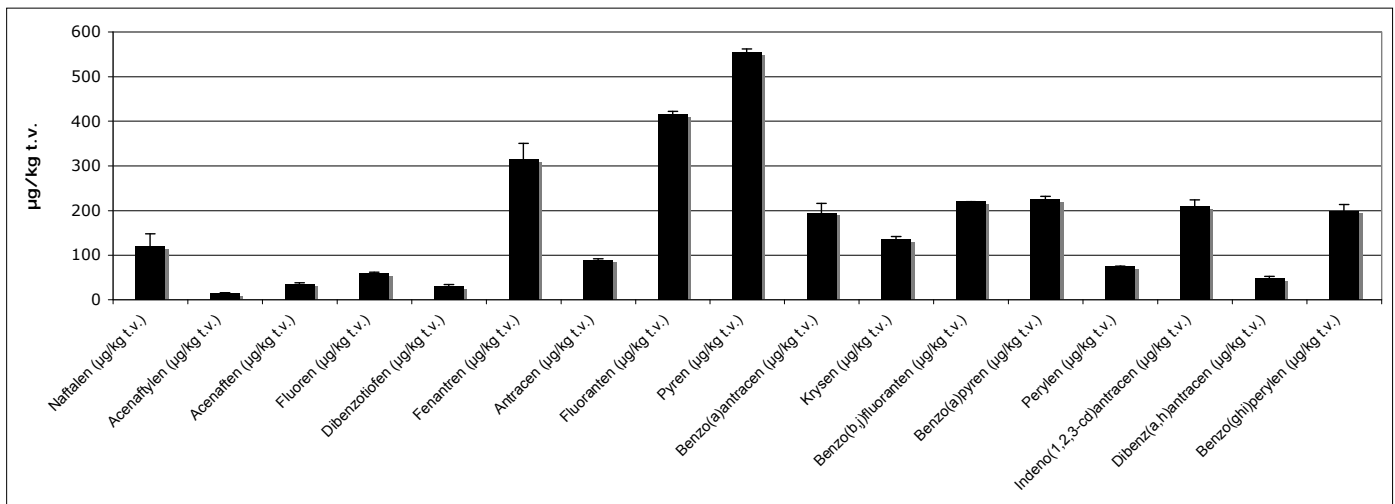
Figur 10 PAH-er i sedimentet fra indre Oslofjord for fôringsforsøket i µg/kg tørrvekt. Streker viser standardavvik. N=2 for alle PAH-er.

Kjemiske analyser av kontrollsedimentet viste at PAH-nivået var lavt sammenliknet med det forurensede sedimentet (figur 11). Det total PAH-innholdet i sedimentet fra indre Oslofjord (fôringsforsøket) var omtrent 40 ganger høyere enn i kontrollsedimentet.



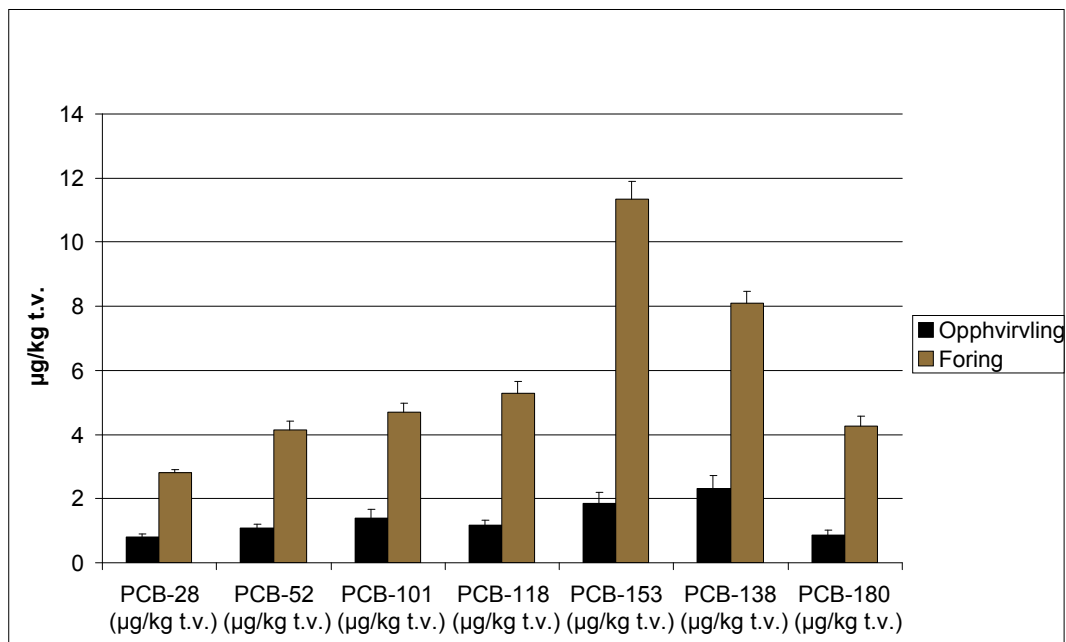
Figur 11 PAH-er i kontrollsedimentet fra ytre Oslofjord for fôringsforsøket i µg/kg tørrvekt. Merk annen akse enn figur 10. N=3 for hver av PAH-ene. Strekene viser standardavvik.

Sedimentet, fra indre Oslofjord i oppvirvlingsforsøket, hadde lavere nivåer av PAH-er enn sedimentet i fôringsforsøket (merk annen akse), men forholdet mellom de ulike PAH-ene var omtrent det samme som i fôringsforsøket. Innholdet av pyren og fenantren var markert høyere enn innholdet av benzo[a]pyren og naftalen (figur 12).



Figur 12 PAH-er i sedimentet fra ytre Oslofjord for oppvirvlingsforsøket i µg/kg tørrvekt: Merk annen akse enn figur 10 og 11. N= 3 for alle PAH-er. Strekene viser standardavvik.

Kjemiske analyser viste at PCB-verdiene lå gjennomsnittlig nesten tre ganger høyere i fôringsforsøkets sediment fra indre Oslofjord i forhold til sedimentet fra oppvirvlingsforsøket. Kontrollsedimentet i fôringsforsøket hadde ingen PCB-verdier over 0,5 µg/kg (figur 13).



Figur 13 PCB i sedimentet fra indre Oslofjord for begge forsøk i µg/kg tørrvekt. N=2 for alle målinger i fôringsforsøket, 3 for oppvirvlingsforsøket. Strekene viser standardavvik.

3.1.2 Kornstørrelse og karboninnhold i sedimentet

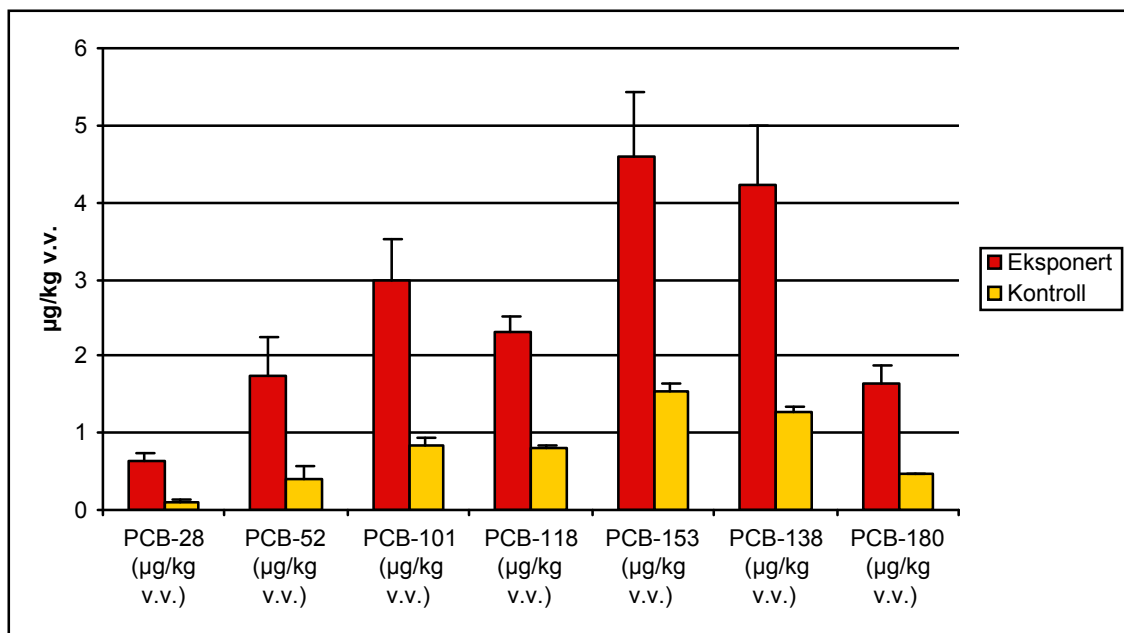
Gjennomsnittlig prosentandel korn i sedimentene under 63 μm , var omtrent likt for alle sedimentene. Karboninnholdet var over 3 ganger høyere i sedimentet fra indre Oslofjord enn i kontrollsedimentet (tabell 2).

Tabell 2 Sedimentenes prosentvise andel korn under 63 μm og karboninnhold i $\mu\text{g}/\text{mg}$

Sediment	Gjennomsnittlig kornstørrelse <63 μm i % tørrvekt	Gjennomsnittlig karboninnhold $\mu\text{g}/\text{mg}$
Oppvirvlingsforsøket	87,3	33,9
Fôringsforsøket (eksponert)	76,3	30,3
Fôringsforsøket (kontroll)	74,8	7,3

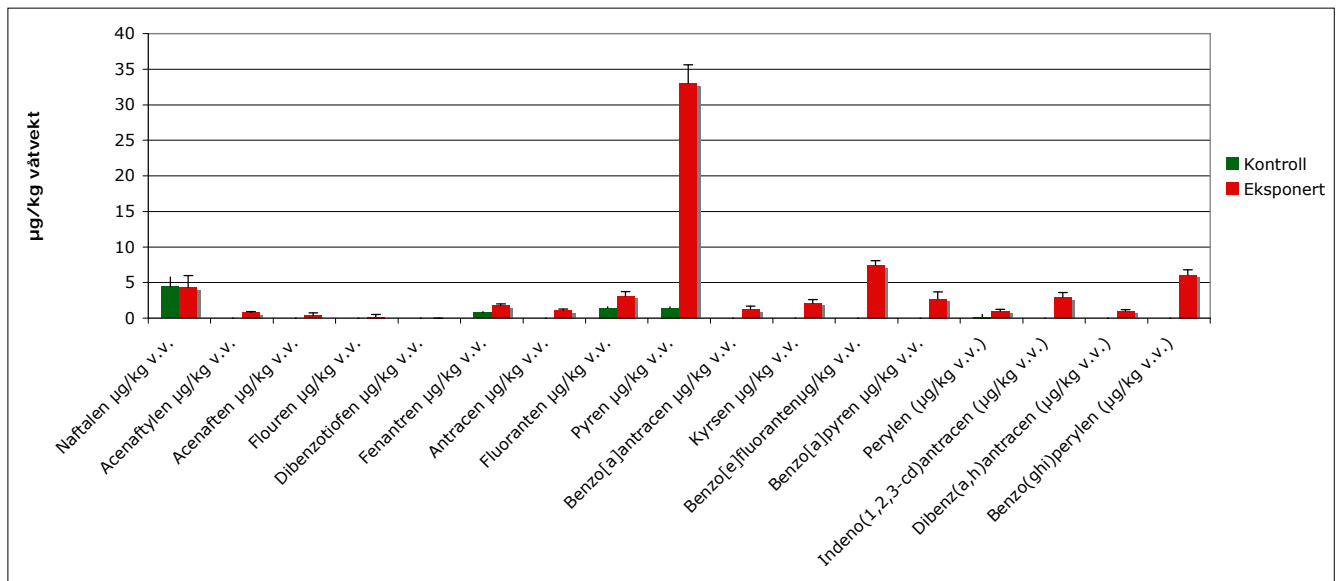
3.2 Kjemiske analyser av børstemark

Kjemiske analyser av PCB i *Nereis virens* viser at konsentrasjonen var tydelig høyere i børstemarken eksponert for sediment fra indre Oslofjord enn børstemark eksponert for sediment fra ytre Oslofjord. Det var høyest verdier for PCB-153 og 138 både i kontrollgruppen og den eksponerte gruppen (figur 14).



Figur 14 PCB-nivåer i $\mu\text{g/kg}$ våtvekt hos *Nereis virens* eksponert for sediment fra indre (eksponert) eller ytre (kontroll) Oslofjord i fôringsforsøket. Strekene viser standardavvik.

Børstemarkens innhold av PAH-er viste seg generelt å være lavt til udetekterbart i kontrollen ($<2 \mu\text{g/kg}$ våtvekt). Unntaket var spesielt for naftalen, hvor kontrollmarken hadde et noe høyere nivå enn den eksponerte. Fenantreninnholdet var cirka dobbelt så høyt i den eksponerte marken som i kontrollmarken. Innholdet av benzo[a]pyren i *Nereis virens* var tydelig i marken eksponert for sediment fra indre Oslofjord, men under deteksjonsgrensen for kontrollmarken. Pyrennivået i den eksponerte marken var markert høyere enn nivået av noen av de øvrige PAH-ene (figur 15).



Figur 15 Gjennomsnittlig innhold av PAH-er i kontrollmark og eksponert mark i µg/kg kroppsvekt. Strekene viser standardavvik. N=3 for kontrollen og 3 for eksponert gruppe for alle PAH-er.

3.3 Fôringsforsøket

3.3.1 PAH-metabolitter i galle

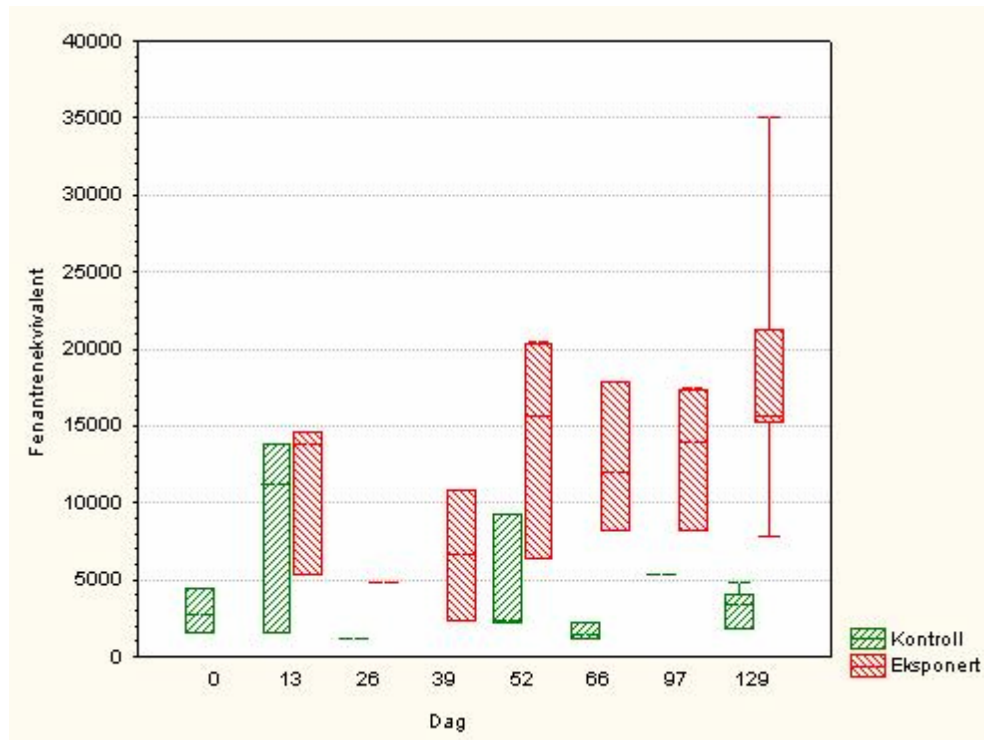
Som nevnt i metodekapittelet, ble all fisk som ikke hadde minimum 10 µl galle, utelatt fra analysen av PAH-metabolitter. Under vises n-verdiene (antall fisk) for PAH-metabolitter i fôringsforsøket (tabell 3).

Tabell 3 Antall replikater (n) i målingene av PAH-metabolitter fôringsforsøk

Dag	Kontroll (n)	Eksponert (n)
0	4	
13	3	3
26	1	1
39	0	2
52	3	3
66	3	3
97	1	3
129	9	8

Nivået av fenantrenmetabolitter så ut til å ha hatt en tilnærmet jevn stigning i den eksponerte fisken mens nivået i kontrollen forholdt seg jevnt lavt. Begge grupper hadde høye verdier ved dag 13 i forhold til tendensen forøvrig (figur 16).

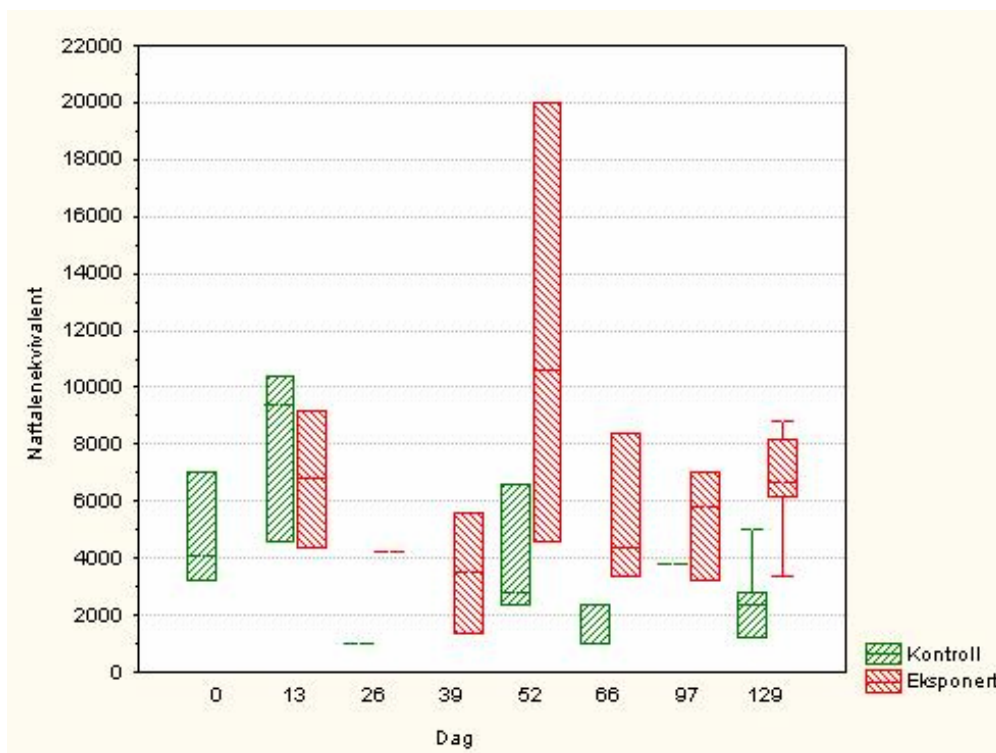
En enveis ANOVA viste at fenantrennivået var signifikant forskjellig over tid hos den eksponerte fisken. En post-hoc Dunnnett-test, viste at nivået i den eksponerte fisken var signifikant forskjellig fra dag null ved dag 129. P-verdien var 0.004. En Kruskal-Wallis-test ga ingen signifikante forskjeller over tid for kontrollgruppen. Den eksponerte gruppen og kontrollgruppen var signifikant forskjellige ved dag 66 ($p=0.017$), og dag 129 ($p<0.000001$)



Figur 16 Fenantrenekvivalenter over tid i fôringsforsøket. Figuren viser median, 15/85-persentiler og min/maks verdier.

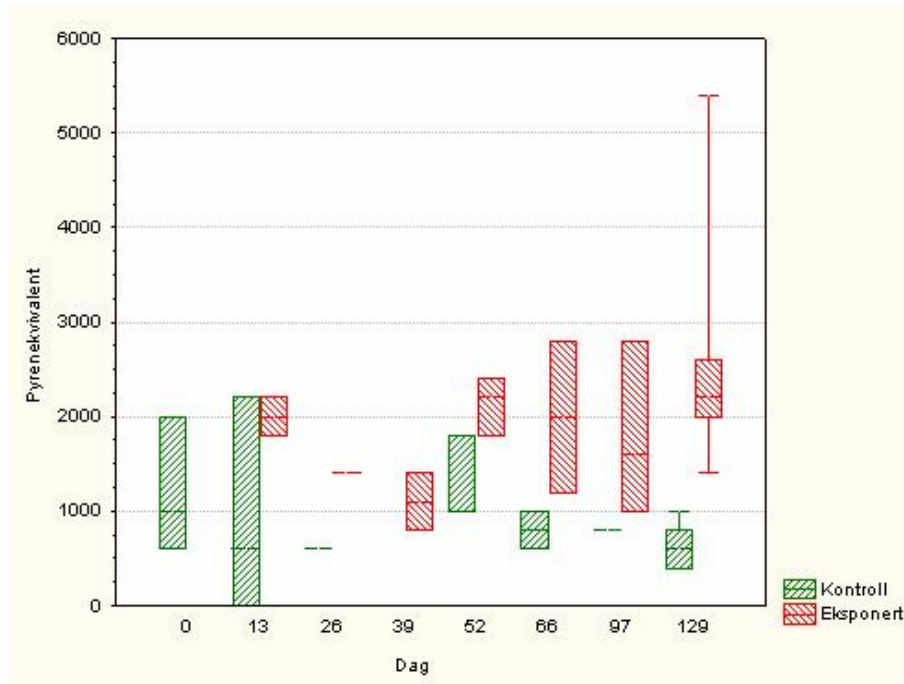
Naftaleninnholdet hos både den eksponerte gruppen og kontrollgruppen, så ut til å ha gått noe i bølger, men verdiene til den eksponerte gruppen lå i hovedsak over de for kontrollen. Ved enkelte tidspunkter hadde dataene svært stor spredning (figur 17).

Det ble ikke funnet noen signifikante forskjeller for naftalen over tid hos den eksponerte fisken. En enveis ANOVA viste at nivået av naftalen i kontrollfisken var signifikant forskjellig over tid ($p=0,003$), men en post-hoc Dunnett-test viste at kontrollfisken ikke var signifikant forskjellig fra dag 0 ved noen av tidspunktene. Den eksponerte gruppen og kontrollgruppen var signifikant forskjellige ved dag 129 ($p=0.00002$).



Figur 17 Naftalenekvivalenter over tid hos fisken eksponert for børstemark.
Figuren viser median, 15/85-persentiler og min/maks verdier.

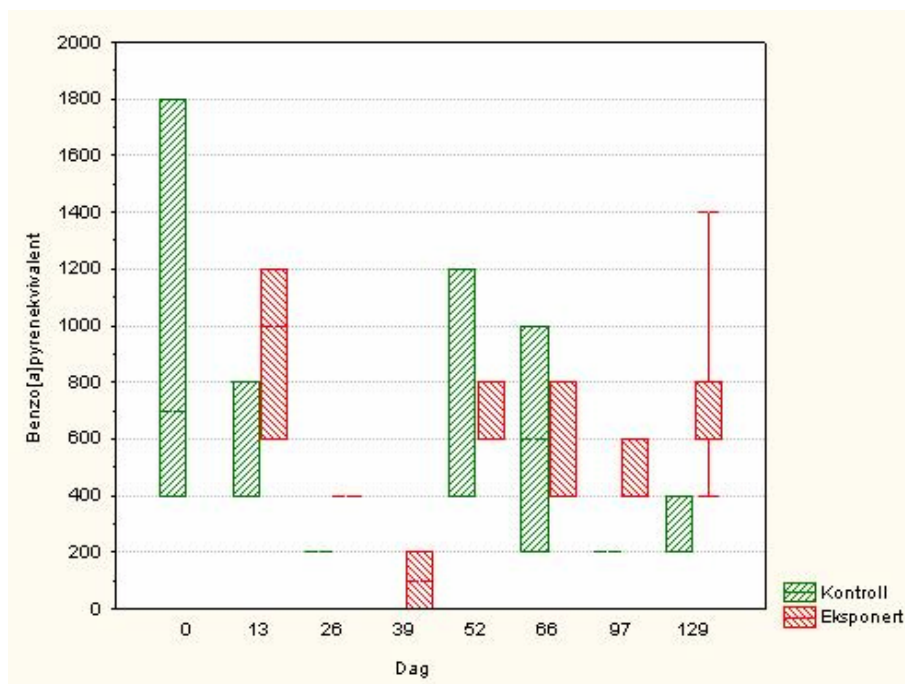
Med unntak av en brå stigning ved dag 13, ser den eksponerte gruppen ut til å hatt et jevnt stigende pyrennivå i gallen fra dag 0 til dag 129. Kontrollfisken hadde generelt lave pyrenverdier gjennom hele forsøket med stor spredning for enkelte av tidspunktene (figur 18). Det ble det ikke funnet noen signifikante forskjeller hos kontrollfisken eller den eksponerte fisken, i nivået av pyrenmetabolitter i gallen, over tid. Ved sammenlikning av eksponert fisk og kontrollfisk ved hvert av prøvetakningstidspunktene, ble det funnet en signifikant forskjell ved dag 129 (0.0006).



Figur 18 Pyrenekvivalenter over tid i fôringsforsøket. Figuren viser median, 15/85-persentiler og min/maks verdier.

For nivået av benzo[a]pyren-metabolitter i gallen, hadde både kontrollgruppen og eksponert gruppe en tilsynelatende nedadgående tendens over tid. Spredningen var stor ved dag 0 og også på andre tidspunkter, særlig i kontrollgruppen (figur 19). Ved dag 129 ser det ut til at den eksponerte gruppen lå ganske høyt i forhold til kontrollfisken, men det var ikke en konsekvent trend at den eksponerte fisken hadde høyere verdier.

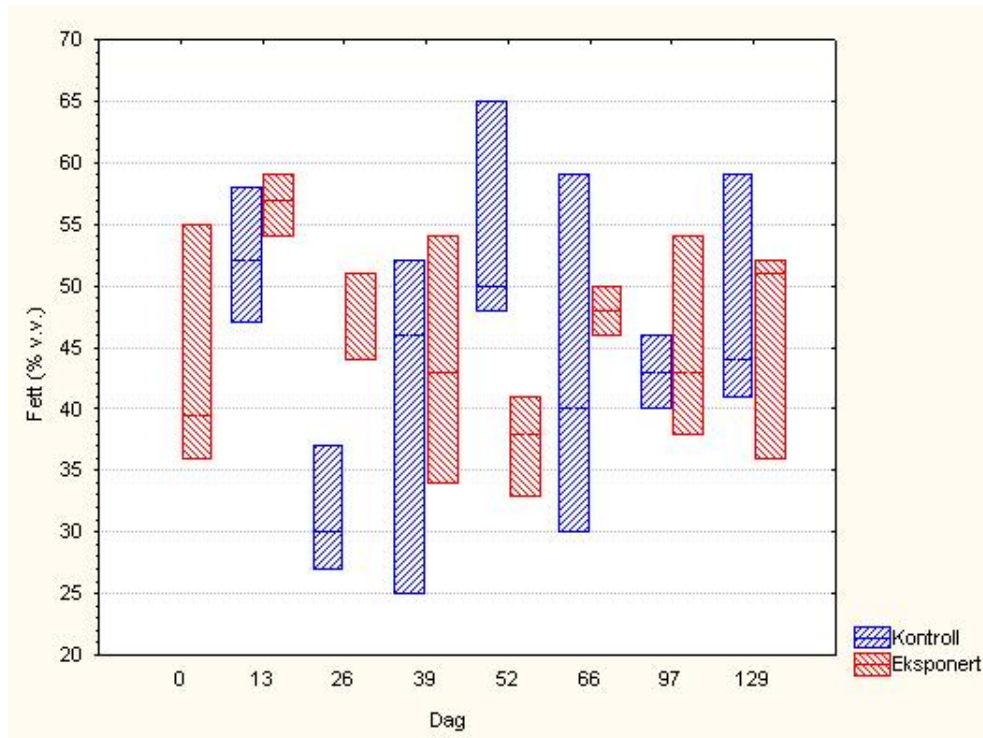
En enveis ANOVA på logtransformerte data viste at kontrollgruppen var signifikant forskjellig i nivået av benzo[a]pyren over tid ($p=0,03$). En post-hoc Dunnett-test, viste at nivået av benzo[a]pyren var signifikant forskjellig fra dag 0 ved dag 129 ($p=0,004$). Det var ingen signifikante forskjeller for den eksponerte fisken over tid. Kontrollgruppen og den eksponerte gruppen var signifikant forskjellige ved dag 129 ($p=0,001$). Medianverdien var på andre tidspunkter høyere for kontrollgruppen enn for eksponert gruppe. Det var stor variabilitet i dataene og derfor vanskelig å se noen klare tendenser.



Figur 19 Benzo[a]pyrenekvivalenter over tid i føringsforsøket. Figuren viser median, 15/85-persentiler og min/maks verdier.

3.3.2 Kjemiske analyser av torskens lever

Prosentandelen fett i fiskens lever så ut til å være forholdsvis stabilt, men noe varierende over tid (figur 20). Fiskens kondisjon så ut til å holde seg stabil over tid, men verdien lå noe under 1 (se vedlegg).

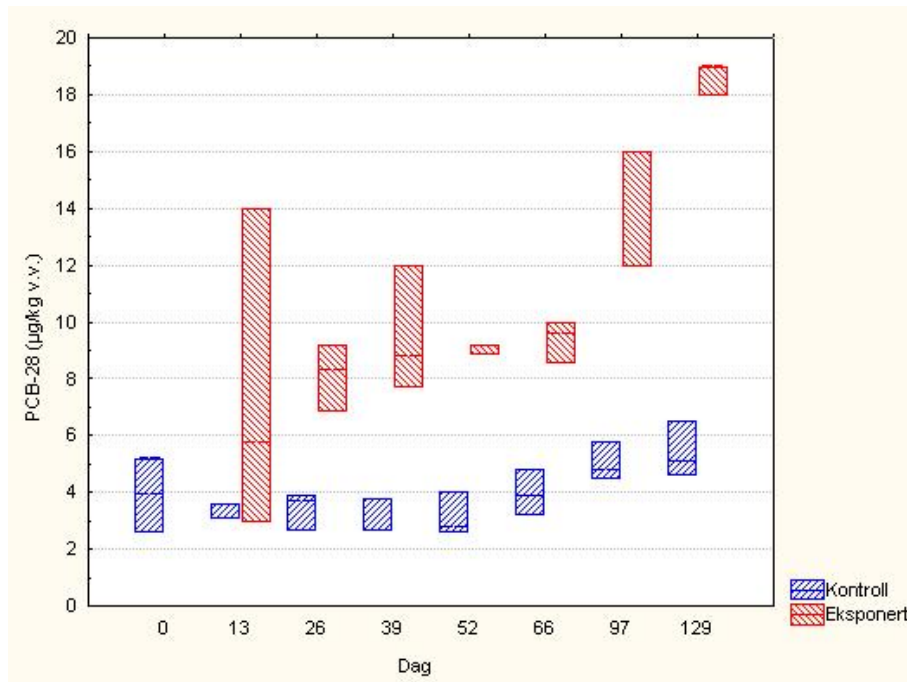


Figur 20 Fettprosent i lever i fisk i foringsforsøket over tid. N= 3 for eksponert og 3 for kontroll ved hvert av tidspunktene.

Innholdet av ulike PCB-konger viste seg å øke tydelig over tid for den eksponerte fisken i foringsforsøket, på tross av at dataene for den eksponerte fisken ofte hadde til dels stor spredning. Det ble funnet en signifikant forskjell over tid, hos den eksponerte fisken, for det totale innholdet av de 7 målte PCB-ene ($p=0,03$, Kruskal-Wallis). Det var dog ingen av tidspunktene som viste seg å være signifikant forskjellig fra dag 0. Hos kontrollfisken var det ingen signifikant forskjell i nivået av det totale PCB-innholdet i leveren. Kontrollgruppen og den eksponerte gruppen var imidlertid signifikant forskjellige ved dag 39 ($p=0,04$), 52 ($p=0,001$), 66 ($p=0,003$), 97 ($p=0,0004$) og 129 ($p=0,007$). Ved ekstrapolering (lineær regresjon) av det totale

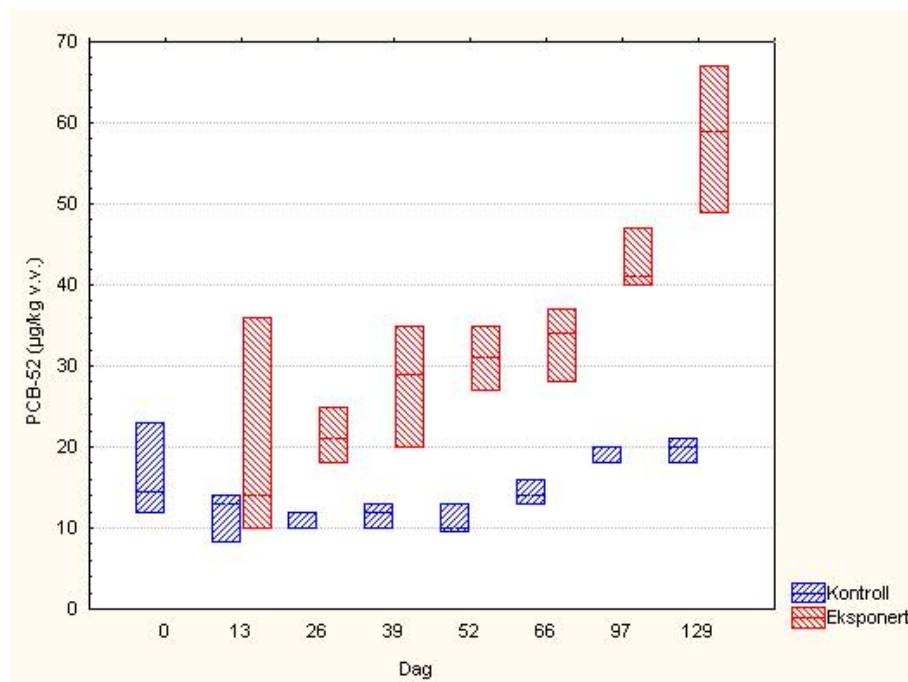
innholdet av PCB-7 ($\mu\text{g/kg}$ våtvekt) i den eksponerte fiskens lever, ble det funnet at det ville ta fra 2,5 til 3 år (900-1200 dager) å nå verdiene som er funnet i torsk fra indre Oslofjord (korrelasjon (r) = 0,7335). Verdiene i torsken fra indre Oslofjord lå på 3000-4000 $\mu\text{g/kg}$ våtvekt i 2005. (Green et al., 2005). I 2005 var konsentrasjonen av PCB-7 i leveren ganske høy i forhold til tall fra foregående år.

PCB-28, 52, 138 og 153 ble studert ytterligere. For den eksponerte fisken i fôringsforsøket var det en signifikant forskjell over tid i nivået av PCB-28 ($p=0,006$ Kruskal-Wallis). Nivået av PCB-28 var signifikant forskjellig fra dag 0 ved dag 97 ($p=0,046$) og 129 ($p=0,003$). Kontrollfisken hadde også et signifikant forskjellig nivå av PCB-28 over tid ($p=0,024$), men ingen av tidspunktene for prøvetakning var signifikant forskjellige fra dag 0. Kontrollgruppen og den eksponert gruppe var signifikant forskjellige med hensyn på nivået av PCB 28 ved dag 26 ($p=0,004$), 39 ($p=0,01$), 52 ($p=0,049$, Mann-Whitney-U), 66 ($p=0,001$), 97 ($p=0,004$) og dag 129 ($p<0,0001$) (figur 21).



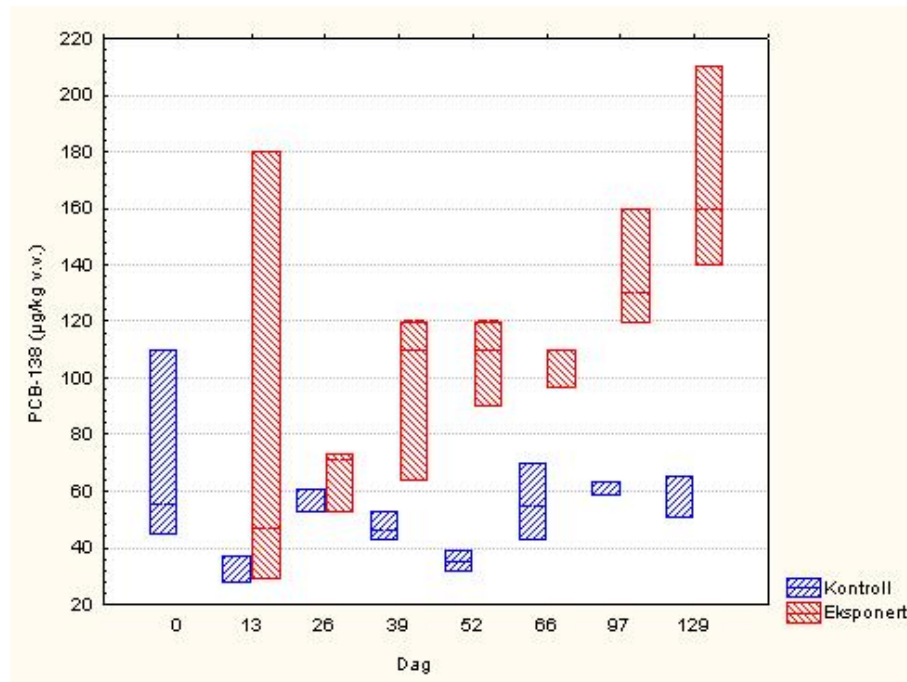
Figur 21 PCB-28 over tid i lever hos fisk fra fôringsforsøket. N for dag 0 er 6 og 3 for kontrollen og 3 for eksponert for de øvrige tidspunktene.

For PCB-52 var nivået i den eksponerte fisken signifikant forskjellig over tid ($p=0,005$, Kruskal Wallis) og ved dag 129 ($p=0,008$) var nivået i fiskene signifikant forskjellig fra dag 0. Kontrollgruppen var også signifikant forskjellig over tid ($p<0,001$) og signifikant lavere enn dag 0 ved dag 52 ($p=0,049$). Kontrollfisken og den eksponerte fisken var signifikant forskjellige ved dag 26 ($p=0,009$), 39 ($p=0,02$), 52 ($p=0,001$), 66 ($p=0,003$), 97 ($p=0,0005$) og 129 ($p=0,002$) (figur 22).



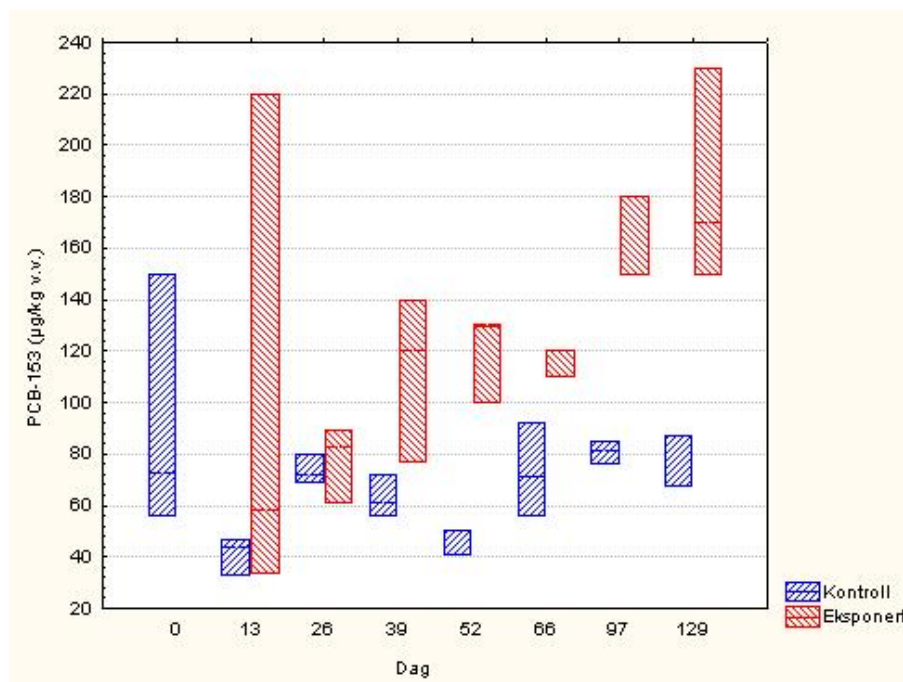
Figur 22 PCB-52 over tid i lever hos fisk fra fôringsforsøket. N for dag 0 er 6 og 3 for kontrollen og 3 for eksponert for de øvrige tidspunktene.

En Kruskal-Wallis-test viste at den eksponerte fisken hadde et signifikant forskjellig nivå av PCB-138 over tid ($p=0,03$). Ved dag 129 var nivået av PCB-138 signifikant forskjellig fra dag 0. Kontrollfisken hadde ingen signifikant variasjon i PCB-138 i løpet av forsøket. Nivået i kontrollfisken og den eksponerte fisken var signifikant forskjellig ved dag 39 ($p=0,03$), 52 ($p=0,001$), 66 ($p=0,005$), 97 ($p=0,0008$) og 129 ($p=0,007$) (figur 23).



Figur 23 PCB-138 over tid i lever hos fisk fra fôringsforsøket. N for dag 0 er 6 og 3 for kontrollen og 3 for eksponert for de øvrige tidspunktene.

Den eksponerte fisken hadde ingen signifikante forskjeller over tid i nivået av PCB-153. Kontrollen derimot hadde det ($p=0,003$) og ved dag 13 ($p=0,002$) og dag 52 ($p=0,015$) var nivået av PCB-153 signifikant lavere enn ved dag 0. De to gruppene av fisk var signifikant forskjellige ved dag 52 ($p=0,002$), 66 ($p=0,02$), 97 ($p=0,0006$) og 129 ($p=0,01$) (figur 24).

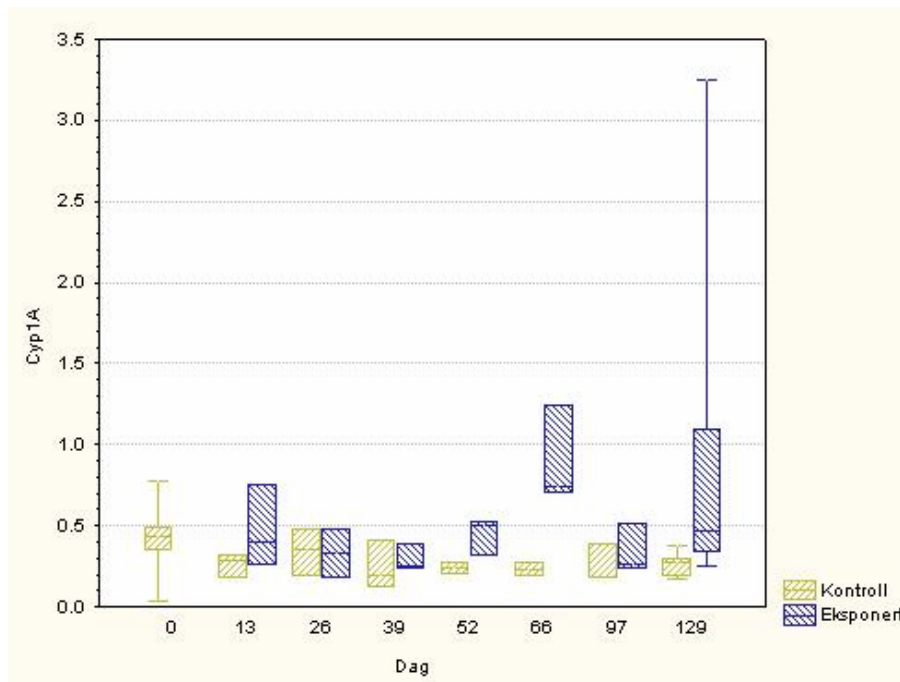


Figur 24 PCB-153 over tid i lever hos fisk fra fôringsforsøket. N for dag 0 er 6 og 3 for kontrollen og 3 for eksponert for de øvrige tidspunktene.

3.3.3 CYP1A

Levermikrosominnholdet av CYP1A i kontrollfisken avtok noe fra dag 0, for så å stabilisere seg noenlunde fra og med dag 52. Når det kom til den eksponerte fisken så dag 66 ut til å ha hatt spesielt høye verdier i forhold til de øvrige tidspunkter. Med unntak av denne dagen og dag 129, så verdiene ut til å ha holdt seg på omtrent samme nivå som ved dag 0 (figur 25).

Det ble ikke funnet noen signifikante forskjeller for CYP1A, verken i den eksponerte gruppen eller kontrollgruppen i over tid, ved en enveis ANOVA. En t-test viste at kontrollgruppen og den eksponerte gruppen var signifikant forskjellige ved dag 52 ($p=0.02$) og dag 66 ($p=0.003$). En Mann-Whitney U-test viste at kontrollgruppen og den eksponerte gruppen også var signifikant forskjellige ved dag 129, med en p-verdi på 0.004.

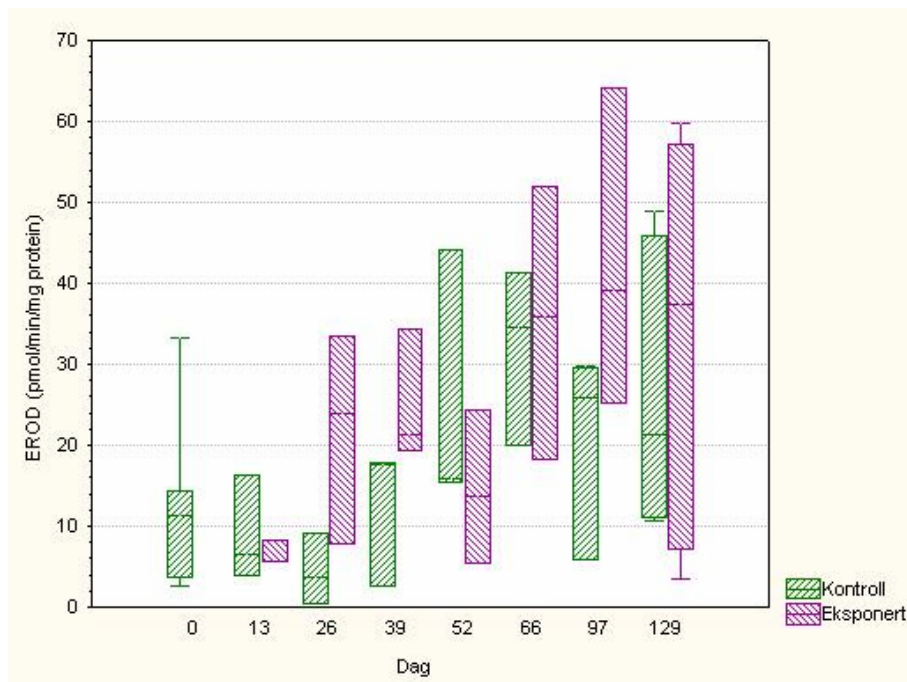


Figur 25 CYP1A i lever hos juvenil torsk prøvetatt på ulike tidspunkter. N for dag 0 er 8. Ved dag 129 har eksponert gruppe 8 replikater mens kontrollen har 9. N er 3 for alle øvrige tidspunkter. Figuren viser median, 15/85-persentiler og min/maks verdier.

3.3.4 EROD

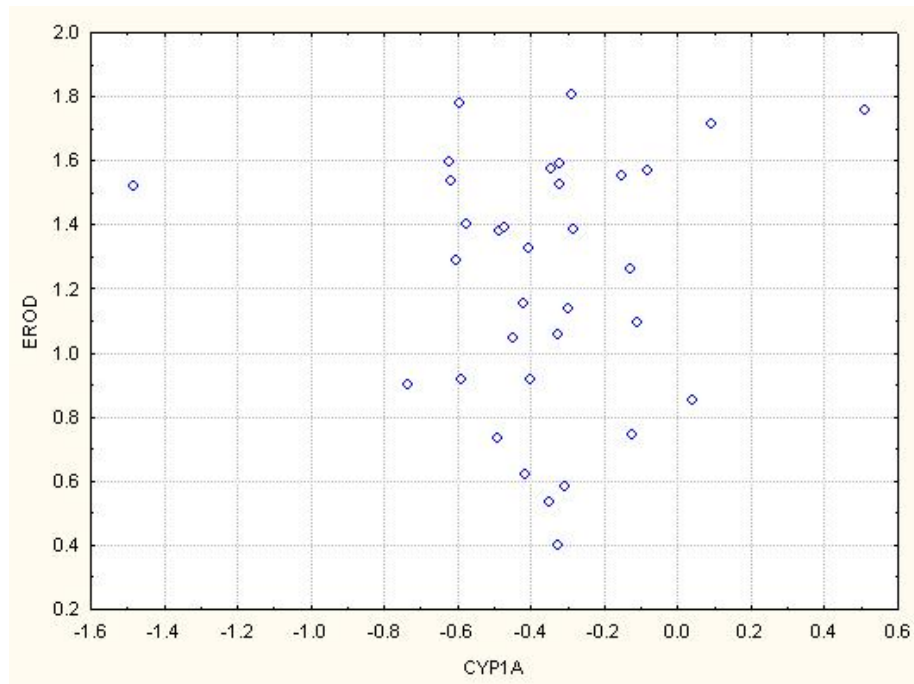
For EROD så det ut til at både kontrollfiskene og den eksponerte fiskene hadde en forholdsvis generell økning over tid, hvor den for den eksponerte fisken synes å ha vært størst. Verdiene hadde særs stor spredning for begge grupper (figur 26).

En enveis ANOVA viste at EROD-nivået var signifikant forskjellig over tid både hos den eksponerte fisken ($p=0.02$) og hos kontrollfiskene ($p=0.04$). En post-hoc Dunnett-test, viste at EROD-nivået hos den eksponerte fisken var signifikant forskjellig fra dag 0 ved dag 97 ($p=0.03$) og dag 129 ($p=0.04$). Kontrollgruppen var ikke signifikant forskjellig fra 0 ved noen av tidspunktene for prøvetakning. Kontrollgruppen var ikke signifikant forskjellig fra den eksponerte gruppen ved noen av tidspunktene.



Figur 26 EROD (pmol/min/mg protein) over tid. Figuren viser median, 15/85-persentiler og min/maks verdier. N for dag 0 er 8. Ved dag 129 har eksponert gruppe 8 replikater mens kontrollen har 9. N er 3 for alle øvrige tidspunkter.

Det så ikke ut til å være noen korrelasjon mellom nivået CYP1A og EROD-aktiviteten hos den eksponerte fisken i fôringsforsøket (figur 27).



Figur 27 Figuren viser sammenhengen mellom nivået av CYP1A og EROD-aktivitet hos den eksponerte fisken i fôringsforsøket. Dataene er log-transformerte.

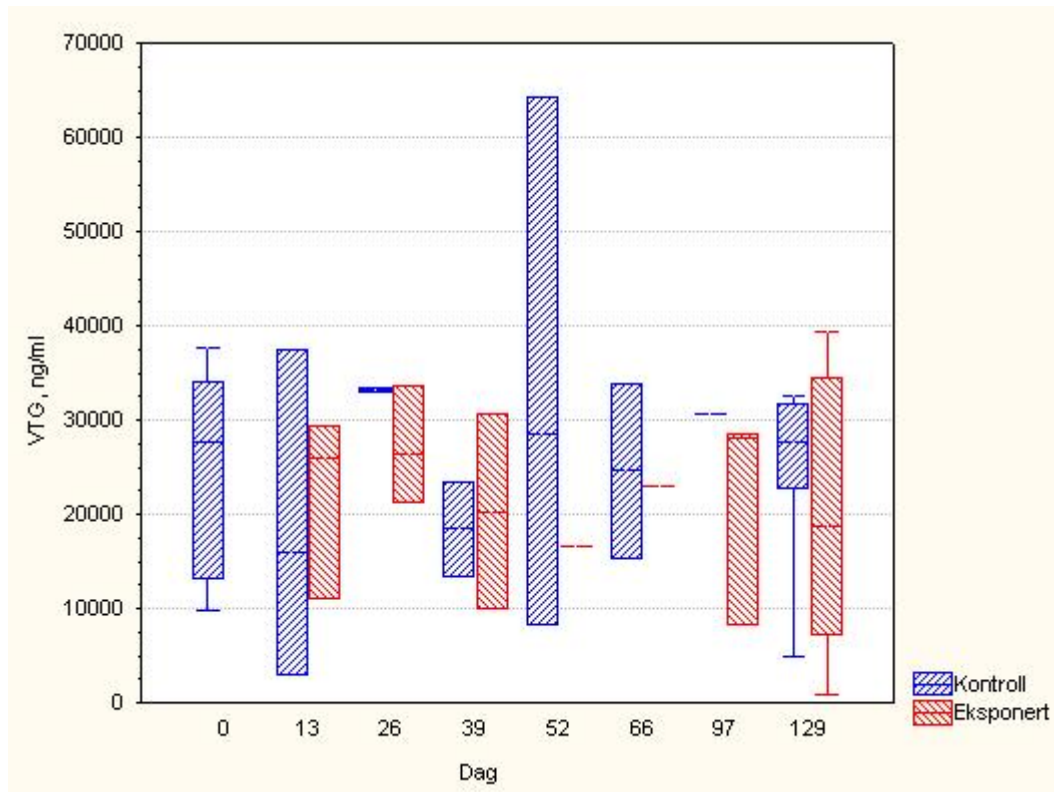
3.3.5 VTG

For målingene av vitellogenin var det vanskelig å se noen spesielle tendenser. Både kontrollgruppen og den eksponerte gruppen hadde generelt stor spredning ved hvert av tidspunktene for prøvetakning, og det kunne ikke sees noen tegn til stigning over tid i den eksponerte gruppen (figur 28). Noen fisk hadde verdier under deteksjonsgrensen (tabell 4) og var dermed ikke med i de statistiske analysene.

Det ble ikke funnet noen signifikante forskjeller for den eksponerte fisken over tid. Det ble heller ikke funnet noen for kontrollfisken. Det var ingen signifikante forskjeller på kontrollgruppen og den eksponerte gruppen ved noen av prøvetakningstidspunktene, med unntak av dag 129 ($p < 0.001$).

Tabell 4 Antall replikater under deteksjonsgrensen i måling av vtg og antall replikater (n) i figur 6

Dag	Kontroll under deteksjonsgrense n	Ekspionert under deteksjonsgrense n	Kontrol l (n)	Eksponer t (n)
0	0		3	
13	0	0	3	3
26	1	0	2	3
39	1	1	2	2
52	0	2	3	1
66	1	2	2	1
97	2	0	1	3
129	2	0	7	8



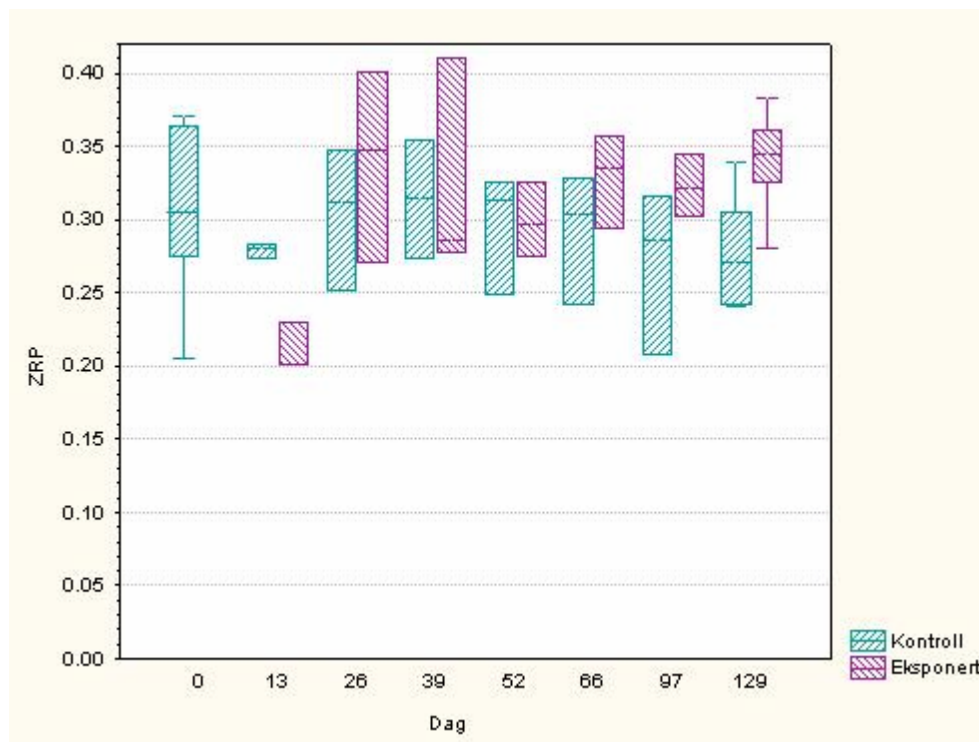
Figur 28 Plasma-vitellogenin i torsk (ng/mL) fôret med børstemark ved ulike tidspunkter. Figuren viser median, 15/85-persentiler og min/maks verdier.

3.3.6 ZRP

Ved dag 0 hadde verdiene for ZRP en ganske stor spredning. Maksimumsverdien var neste dobbelt så høy som minimumsverdien. Kontrollfiskene hadde ellers ganske jevne verdier frem mot dag 52, hvor de sakte avtok noe frem til og med dag 129. Den eksponerte fisken hadde lave verdier ved dag 13 sammenliknet med det generelle bildet for dag 0. Ved dag 26 hadde ZRP-verdiene steget igjen. ZRP-nivået hadde igjen en viss nedgang ved dag 39, men stiger var så tilnærmet jevnt frem til og med dag 129. Nivået ved dag 129 var likevel ikke markert høyere enn verdiene for dag 0 (figur 29).

En enveis ANOVA viste en signifikant forskjell hos den eksponerte fiskens ZRP-nivå over tid, med en p-verdi på 0,03. En post-hoc Dunnnett-test, viste at den eksponerte fisken ved dag 13 var signifikant forskjellig fra dag 0 ($p=0.045$). Kontrollfiskens

ZRP-nivå var ikke signifikant forskjellig ved noen av tidspunktene. Kontrollgruppen var signifikant forskjellig fra den eksponerte gruppen ved dag 13 ($p=0.002$) og dag 129 ($p=0.003$).



Figur 29 ZRP mot dag N for dag 0 er 7. Ved dag 129 har eksponert gruppe 7 replikater mens kontrollen har 8. N er 3 for alle øvrige tidspunkter. Figuren viser median, 15/85-persentiler og min/maks verdier.

3.4 Oppvirvlingsforsøket

3.4.1 PAH-metabolitter i galle

Som nevnt i metodekapittelet ble det tatt galleprøver av all fisk i oppvirvlingsforsøket. Ved dag 66 og dag 129, ble det tatt prøver av 6 kontrollfisk og 6 eksponerte fisk mot normalt 3. Enkelte fisk hadde for lite galle til analyse også i dette forsøket (tabell 5).

*Tabell 5 Antall replikater (n) i målingene av PAH-metabolitter
sedimentforsøket*

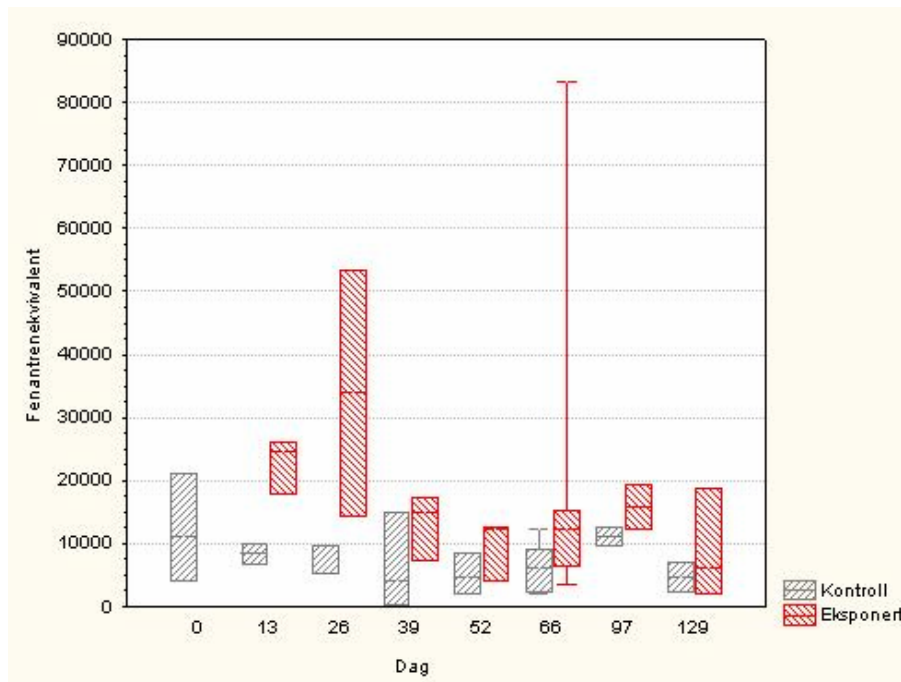
Dag	Kontroll (n)	Eksponert (n)
0	5	
13	2	3
26	3	2
39	3	3
52	3	3
66	8	9
97	2	2
129	6	6

Det var ingen signifikante forskjeller mellom kjønnene for noen av PAH-metabolittene.

For kontrollgruppen var det et generelt lavt nivå av fenantren over tid. For eksponert gruppe var det en ganske markant stigning for fenantren ved dag 13. Nivået fortsatte å stige mot dag 26, men hadde her større spredning enn ved dag 13. Etter dag 26 gikk nivået av fenantren noe i bølger fram mot dag 129. Nivåene lå generelt alltid høyere for den eksponert fisken enn for kontrollfisken (figur 30).

Det ble ikke funnet noen signifikante forskjeller i fenantrennivået over tid hos den eksponerte fisken. Det ble heller ikke funnet noen signifikante forskjeller for

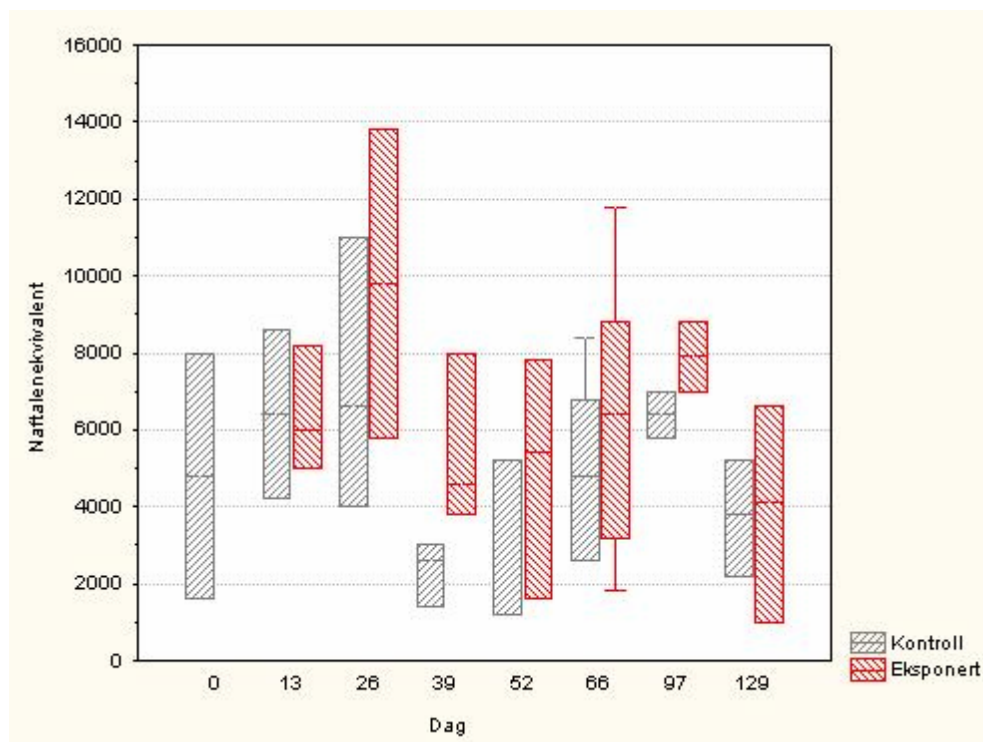
kontrollfisk. Kontrollfisk og den eksponerte fisk var signifikant forskjellige ved dag 13 ($p=0.02$). Kontrollfisk hadde nesten ingen spredning ved dag 13 i forhold til dag 0.



Figur 30 Fentanrenekvivalenter over tid i oppvirlingsforsøket. Figuren viser median, 15/85-persentiler og min/maks verdier.

For naftalen steg nivået i både kontrollgruppen og den eksponerte gruppen mellom dag 0 og dag 26, men avtok etter dette mot dag 39. Avtakningen var nokså betraktelig for kontrollgruppen, men mindre markant i den eksponerte gruppen. Verdiene for begge grupper steg igjen mot dag 97, for igjen å avta ved dag 129. Spredningen i verdiene for begge grupper var betydelige (figur 31).

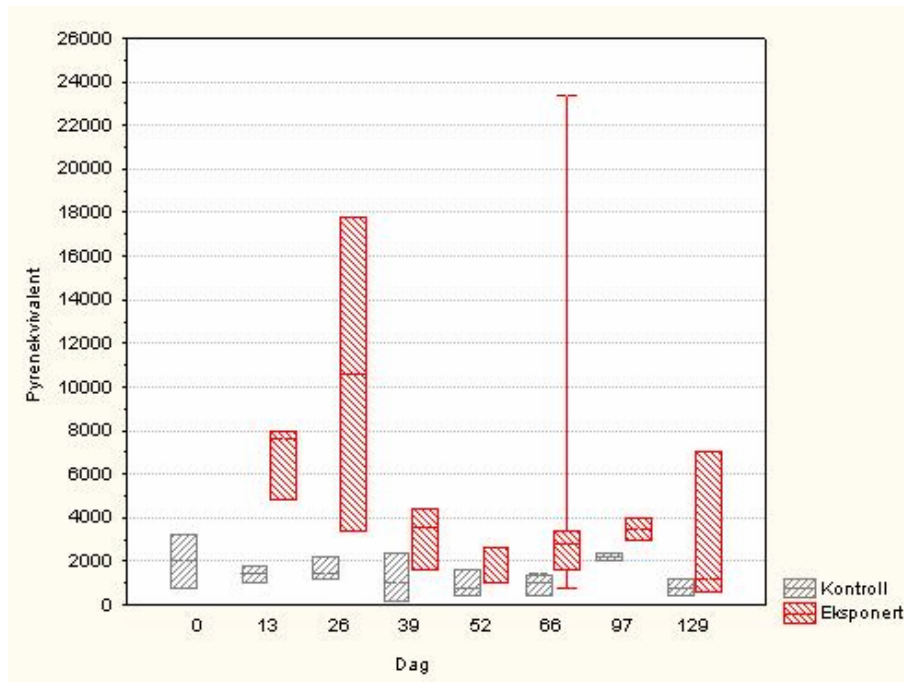
Heller ikke for naftalen ble det funnet noen signifikante forskjeller verken hos den eksponerte fisken eller hos kontrollfisken over tid. Det var ingen signifikante forskjeller på kontrollgruppen og den eksponerte gruppen ved noen av prøvetakningstidspunktene.



Figur 31 Naftalenekvivalenter over tid i fisken fra oppvirlingsforsøket.
Figuren viser median, 15/85-persentiler og min/maks verdier.

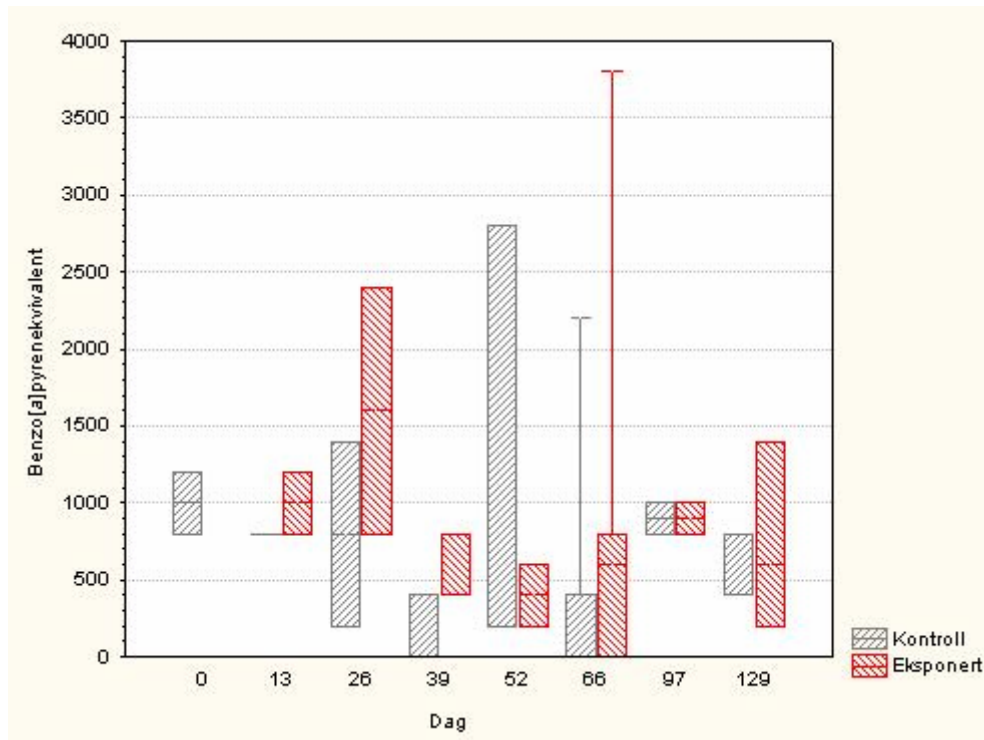
For kontrollfisken var nivået av pyren generelt nedadgående fra dag 0 og mot dag 129. Den eksponerte fisken derimot, hadde en økning i pyrenmetabolitter fra dag 0 til dag 13 og videre mot dag 26, selv om spredningen her var betraktelig større. Nivået hos den eksponerte fisken sank etter dette igjen, med unntak av en liten oppgang mot dag 97. Også kontrollfiskens nivå av pyrenmetabolitter hadde en liten økning her (figur 32).

Det var ingen signifikante forskjeller på den eksponerte fisken over tid når det kom til innholdet av pyrenmetabolitter i gallen. Ved en enveis ANOVA, ble heller ikke funnet noen signifikante forskjeller for kontrollfisken. Kontrollgruppen var signifikant forskjellig fra den eksponerte gruppen når det kom til pyren ved dag 13 ($p=0.03$). Kontrollfisken hadde mindre spredning ved dag 13 enn ved dag 0.



Figur 32 Pyrenekvivalenter over tid i oppvirvlingsforsøket. Figuren viser median, 15/85-persentiler og min/maks verdier.

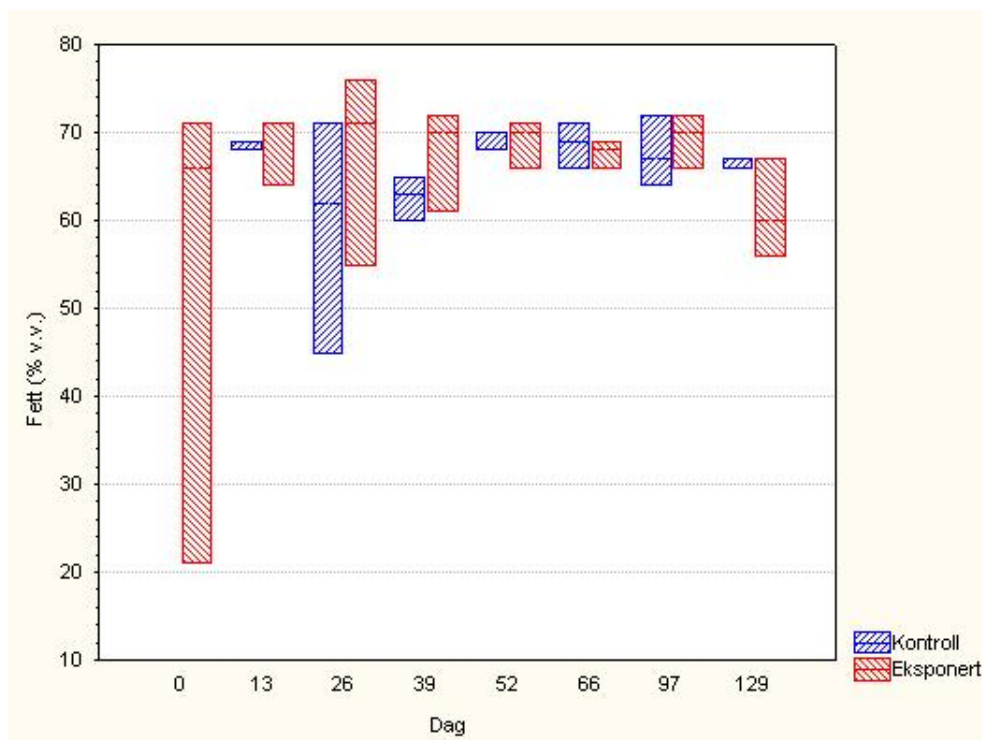
Nivået av benzo[a]pyren ser ut til å ha fulgt det samme mønsteret i både kontrollfisk og den eksponerte fisken. Dataene har preg av stor spredning og av å ha gått i bølger. Det ble ikke funnet noen signifikante endringer i nivået av benzo[a]pyren tid hos verken den eksponerte fisken eller kontrollfisk. Det var ingen signifikante forskjeller på kontrollfisk og den eksponerte fisken ved noen av tidspunktene (figur 33).



Figur 33 Benzo[a]pyrenekvivalenter over tid i oppvirlingsforsøket. Figuren viser median, 15/85-persentiler og min/maks verdier.

3.4.2 Kjemiske analyser av fiskens lever

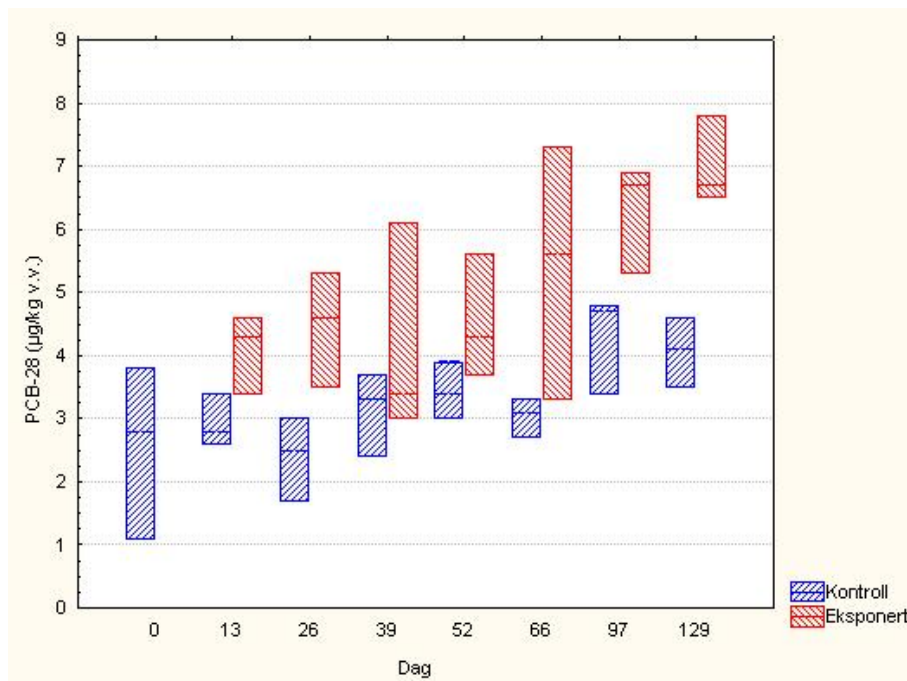
Fiskens nivå av fett i leveren så ut til å være stabilt over tid. Spredningen var stor ved dag 0 (figur 34). Generelt lå fettprosenten 10-20% høyere for fisken i oppvirlingsforsøket enn fisken i føringsforsøket. Kondisjonen lå generelt rundt faktor 1 (se vedlegg).



Figur 34 Fettprosent i lever hos kontrollfisk og eksponert fisk over tid i oppvirlingsforsøket. N= 3 for hver av gruppene ved hvert tidspunkt.

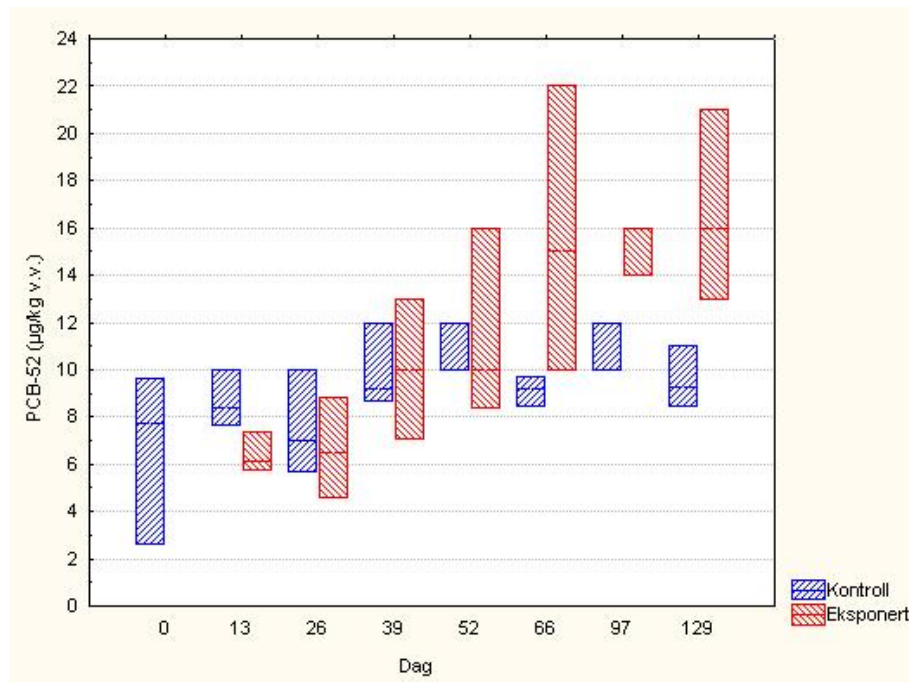
Innholdet av lavklorerte PCB-kongerer (for eksempel 28 og 52) viste seg å øke tydeligere hos den eksponerte fisken enn i kontrollfisken over tid. For andre mer høyklorerte PCB-er, som PCB-138 og PCB-153, så både kontrollen og eksponert gruppe ut å ha økt ganske likt. For den totale mengden av de 7 målte PCB-ene var nivået, i den eksponerte fisken i oppvirlingsforsøket, signifikant forskjellig over tid ($p=0,02$). De eksponerte fiskenes nivå var også signifikant forskjellig fra dag 0 ved dag 129 ($p=0,01$). Kontrollfiskens nivå av de 7 PCB-ene var ikke signifikant forskjellig over tid. Den totale PCB-mengden var heller ikke signifikant forskjellig mellom kontrollen og eksponert gruppe ved noen av tidspunktene. Ved ekstrapolering (lineær regresjon) av det totale innholdet av PCB-7 ($\mu\text{g/kg}$ våtvekt) i den eksponerte fiskens lever, ble det funnet at det ville ta fra 14-18 år (5000-6500 dager) for den eksponerte fisken å nå samme nivå som fisken i Oslofjorden (i 2005) (korrelasjon (r) = 0,7119) (Green et al., 2005).

For PCB-28 (figur 35) hadde den eksponerte fisken et signifikant forskjellig nivå over tid ($p=0,002$) og ved dag 66 til og med dag 129 var det signifikant forskjellig fra dag 0. P-verdiene var henholdsvis 0,028, 0,002 og 0,0004. Kontrollfisken hadde ikke et signifikant forskjellig nivå av PCB-28 over tid. Den eksponerte fisken og kontrollfisken var signifikant forskjellig ved dag 26 ($p=0.03$), 97 ($p=0.04$) og 129 ($p=0.005$).



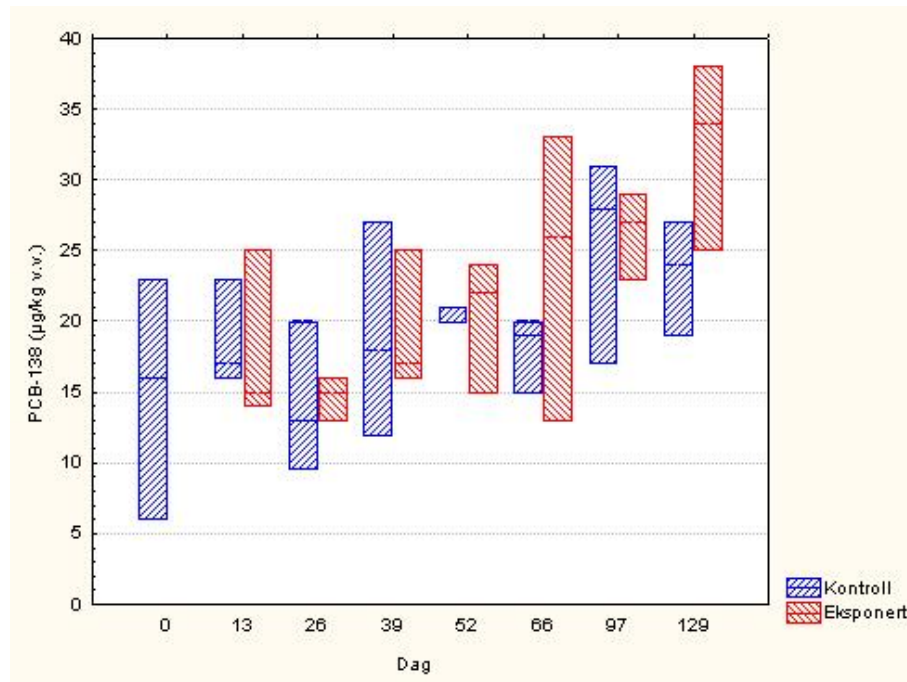
Figur 35 PCB-28 over tid i lever fra fisk i oppvirvlingsforsøket. N for dag 0 er 6 og 3 for kontrollen og 3 for eksponert for de øvrige tidspunktene.

Nivået av PCB-52 var signifikant forskjellig over tid i den eksponerte fisken ($p=0,003$) og signifikant forskjellig fra dag 0 ved dag 66, 97 og 129. P-verdien var henholdsvis 0,017, 0,014, 0,008. Kontrollfiskens nivåer var ikke signifikant forskjellig over tid, men kontrollen var signifikant forskjellig fra den eksponerte fisken ved dag 97 ($p= 0.013$) og 129 ($p= 0.045$) (figur 36).



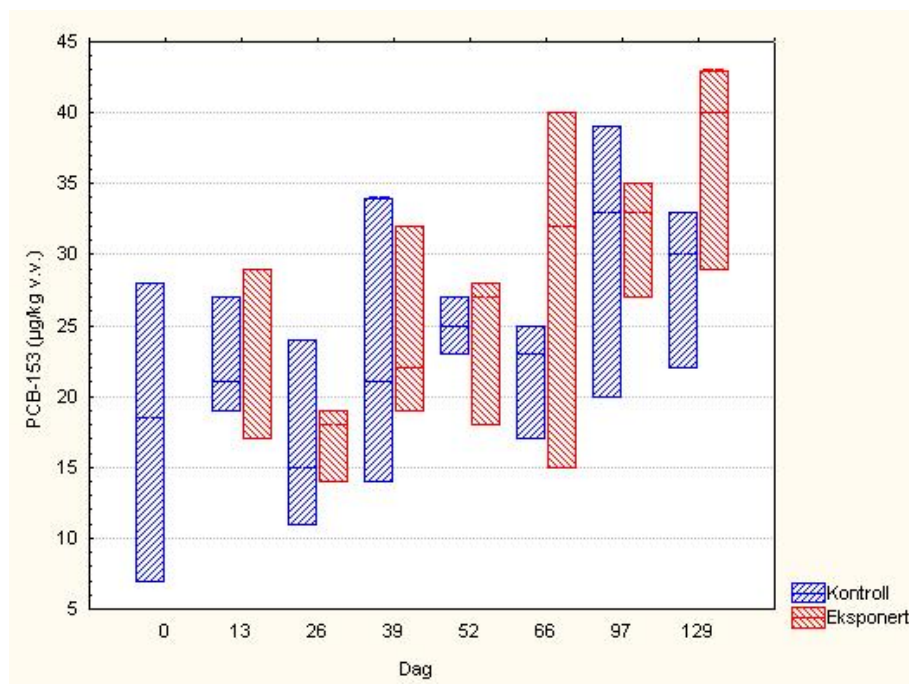
Figur 36 PCB-52 over tid i lever fra fisk i oppvirlingsforsøket. N for dag 0 er 6 og 3 for kontrollen og 3 for eksponert for de øvrige tidspunktene.

Når det kom til PCB-138 (figur 37) hadde den eksponerte fisken et signifikant forskjellig nivå over tid ($p=0.02$). Ved dag 129 var også nivået i fiskene signifikant forskjellig fra nivået ved dag 0 ($p=0.007$). Kontrollgruppen hadde ikke et signifikant forskjellig nivå av PCB-138 over tid. Eksponert gruppe og kontrollgruppen var aldri signifikant forskjellige.



Figur 37 PCB-138 over tid i lever fra fisk i oppvirlingsforsøket. N for dag 0 er 6 og 3 for kontrollen og 3 for eksponert for de øvrige tidspunktene.

Hos den eksponerte fisken var nivået av PCB-153 signifikant forskjellig over tid ($p=0,03$) og det ble funnet at nivået var signifikant forskjellig fra dag 0 ved dag 129 ($p=0,013$). Kontrollen hadde ikke et signifikant forskjellig nivå av PCB-153 over tid og kontrollgruppen og den eksponerte gruppen var aldri signifikant forskjellige (figur 38).



Figur 38 PCB-153 over tid i lever fra fisk i oppvirvlingsforsøket. N for dag 0 er 6 og 3 for kontrollen og 3 for eksponert for de øvrige tidspunktene.

4. Diskusjon

4.1 Kondisjon hos fisken

Torsken i fôringsforsøket hadde meget god kondisjon og viste ingen tegn til sykdom. Noen av fiskene i oppvirvlingsforsøket hadde svartprikk (Paravortex, tubellariaormer). Fiskene økte noe i vekt utover i begge forsøkene. De kjemiske analysene viste at fettnivået i torskens lever i fôringsforsøket forholdt seg jevnt over tid. Fettprosenten hos fisken i oppvirvlingsforsøket var noe høyere enn den for fisken i fôringsforsøket, men holdt seg også her på et jevnt nivå i løpet av forsøket. Kondisjonen var jevn i begge forsøkene. Potensialet til opptak i denne studien har derfor sannsynligvis ikke være påvirket av svingninger i fettprosenten eller av at fisken fikk for lite næring.

Torsk beiter naturlig på børstemark og *Nereis virens* er svært vanlig føde for torsk. Ute i naturen er det likevel også vanlig at torsk har et blandet kosthold bestående av mange ulike børstemarkarter og blant annet krabbe, krill, reker og fisk (Kanapathippillai et al., 1994). Fødeinntaket i dette forsøket vil derfor kanskje ikke fullstendig reflektere torskens naturlige fødetilstand.

Dersom torsk blir utsatt for stress, kan dette blant annet påvirke deres hormonproduksjon (Barton, 2002). Fisken i dette forsøket har vært utsatt for et unaturlig miljø og det kan ikke utelukkes at stress kan ha hatt en viss effekt på resultatene. Det kan likevel bemerkes at torsken ble svært tam i løpet av fôringsforsøket, og at den viste få synlige tegn på stress.

4.2 Fôringsforsøket

En del torsk ble eksponert for et sediment fra indre Oslofjord og en annen for et kontrollsediment, i maksimum 129 dager, via børstemarken *Nereis virens*, før de ble

analysert for akkumulering av miljøgifter og eventuelle effekter av disse. Resultatene viste at innholdet av PCB i leveren økte over tid hos fisk eksponert for sediment fra indre Oslofjord. Det var også tegn til en akkumulering av PAH-metabolitter i gallen hos den samme fisken over tid. For CYP1A og EROD var resultatene noe tvetydige, mens det for vitellogenin og zona-radiata så ut til å være små variasjoner over tid.

4.2.1 Akkumulering

Innholdet av PCB i fiskens lever var tydelig økende over tid i den eksponerte fisken i fôringsforsøket. Dette gjaldt både for tungt fettløselige og mer flyktige PCB-er. Nivået i den eksponerte fisken lå også jevnt signifikant høyere enn kontrollfiskens utover i forsøket. Disse resultatene viste at PCB tas opp og akkumulerer i leveren til fisk eksponert for miljøgifter via *Nereis virens*. Ekstrapolering til nivåer av den totale andelen av PCB-7 i fiskens lever, til de nivåene som finnes i fisk i indre Oslofjord, viste at det ville ta omlag 2-3 år for fisken i fôringsforsøket å nå økologisk relevante verdier. Denne beregningen tok ikke hensyn til at fisken ville øke sin vekt med tiden og dermed få en høyere konsentrasjon av PCB i leveren som følge av økt fødeopptak og som følge av at leveren vokser. Resultatet indikerer likevel at føde ser ut til å være en effektiv kilde til PCB.

Resultatene fra de kjemiske analysene indikerte at *Nereis virens* akkumulerer PCB, og blant annet PAH-ene naftalen, fenantren, pyren og benzo[a]pyren, fra sedimentet. Dette støtter opp om resultater fra tidligere undersøkelser som har vist at *Nereis virens* akkumulerer PAH-er (McElroy, 1985; McElroy et al., 1990) og PCB-er (Pruell et al., 1993) fra sediment. *Lumbriculus variegatus* (Oligochaeta) viste seg å ta opp PAH-er mer effektivt via føden ved direkte beiting på sedimenter enn via porevannet (Leppanen og Kukkonen, 1998; Leppanen og Kukkonen, 2000). *Nereis virens* er en predator, men beiter også på sediment med høyt organisk innhold (Rubinstein et al., 1983). *Nereis virens* har sannsynligvis et lavere potensial til å ta opp og akkumulere PAH-er enn børstemark som i hovedsak beiter på sedimentet. Fordi PAH-er og PCB-er lipofile kan de tas opp av bentiske organismer både gjennom maten og gjennom

diffusjon via epitelet (Ariese et al., 2005). Dette er et resultat av likevekt mellom konsentrasjonen i sedimentet og porevannet samt organismens fettinnhold (Cornelissen et al., 2006). I denne studien ble borsemarken rikelig fôret. Det blir derfor regnet som sannsynlig at hovedparten av miljøgiftene fra sedimentet har kommet inn i marken via kroppsveggen og gjellene.

Det var små forskjeller i konsentrasjonene av miljøgifter i *Nereis virens* over tid, noe som tyder på at likevekt ble oppnådd. *Nereis virens* har vist seg å oppnå en likevekt i forhold til PCB-innholdet i sediment i miljøet etter 1 til 2 måneder (Rubinstein et al., 1983). *Nereis diversicolor* brukte nesten tilsvarende tid på å komme i likevekt med PCB i sediment, men hvor lang tid det tok før likevekt ble oppnådd viste seg å være doseavhengig (Fowler et al., 1978). Det har på bakgrunn av disse funnene blitt spekulert på om det tar lenger tid før likevekt oppnås dersom konsentrasjonen av PCB i sedimentet er høy (McLeese et al., 1980). Sannsynligvis er tiden før likevekt oppnås snarere et resultat av hvor fettløselige PCB-ene er. Generelt har det vist seg at likevekt oppnås innen 4 uker (Lee et al., 1991).

Det er funnet store forskjeller mellom flerbørstemark og evertebrater generelt når det kommer til evnen til å metaboliserer PAH-er (Ariese et al., 2005; Driscoll og McElroy, 1996). *Nereis virens* har vist seg å akkumulere og skille ut både PCB-er (Ernst et al., 1977; Pruell et al., 1993) og PAH-er (Jørgensen et al., 2005; McElroy, 1990; Rust et al., 2004). Rust et al. (2004) konkluderte med at *Nereis virens* var så effektiv til å metabolisere benzo[a]pyren at de frarådet å bruke denne arten i studier av bioakkumulering av PAH-er. Driscoll og McElroy (1996) anbefaler også bruk av ikke-metaboliserende flerbørstemark i forsøk med bioakkumulering av sedimentbundne miljøgifter. Årsaken til at *Nereis virens* ble brukt som forsøksdyr i denne studien var at *Nereis virens* er en svært utbredt art i Nord-europeiske farevann (Kristensen, 1984), et meget relevant forsøksdyr rent økologisk og også en hyppig brukt art i vitenskaplige studier. Det ble regnet som mer fornuftig å benytte en art det har blitt utført betydelig forskning på enn en mindre kjent en. *Nereis virens* var også tilgjengelig kommersielt og det var mulig å skaffe et stort kvantum mark. Det var

også ønskelig at marken var så ren og homogen som mulig ved forsøkets start og det var derfor mest praktisk å bruke mark fra oppdretter.

Andelen finpartikulært sediment var omtrent lik for de ulike sedimentene, men sedimentet i oppvirvlingsforsøket inneholdt cirka 10% mer finkornet sediment enn de øvrige. Fordi finkornet sediment generelt har en høyere konsentrasjon av miljøgifter enn grovkornet sediment, er det noe overraskende at sedimentet fra indre Oslofjord, brukt i fôringsforsøket, totalt hadde over 4 ganger høyere konsentrasjoner av PCB enn sedimentet i oppvirvlingsforsøket. Denne store forskjellen i konsentrasjon er høyst sannsynlig et resultat av at variasjoner innad i lokaliteter for innsamling av sedimentet kan ha blitt undervurdert. På denne måten kan man ha vært uheldig og samlet inn små mengder sterkt forurensset sediment som ikke ble spredt godt nok. Slik kan enkelte av kassene med sediment til slutt ha inneholdt høyere konsentrasjoner av miljøgifter enn andre. Det samme gjaldt for innholdet av PAH-er, hvor sedimentet i fôringsforsøket hadde tydelig høyere verdier enn sedimentet i oppvirvlingsforsøket.

Innholdet av organisk karbon var over tre ganger høyere i sedimentene fra indre Oslofjord enn det fra ytre fjord. Dette kan ha forårsaket at miljøgifter i kontrollsedimentet var mer biotilgjengelige. Resultatene viste at PAH-innholdet i kontrollsedimentet i fôringsforsøket totalt var omtrent en 25-del av sedimentet fra indre Oslofjord. *Nereis virens*' totale innhold av PAH-er var imidlertid kun cirka 8 ganger høyere i den eksponerte marken enn i kontrollmarken. Det totale innholdet av PCB i kontrollmarken fra fôringsforsøket var rundt en 3-del av innholdet i marken eksponert for sediment fra indre fjord. På tross av at innholdet av PCB i kontrollsedimentet var under deteksjonsgrensen var altså innholdet i kontrollmarken kun en 3-del av innholdet i marken eksponert for tydelig forurensset sediment. Disse resultatene kan dermed være med på å underbygge betydningen av karbon for biotilgjengeligheten til miljøgifter i sediment (se blant annet Koelmans et al (2006) og Cornelissen et al. (2006; 2005)). Ghosh et al. (2000) fant at selv om partikulært organisk karbon kun utgjorde 5% av partiklene i sediment, inneholdt det hele 65% av

det totale innholdet av PAH-er. Ideelt sett burde karboninnholdet derfor vært likt i alle sedimentene.

Det er viktig å understreke at de kjemiske analysene ikke gir et fullstendig bilde av stoffene som organismene i dette forsøket kan ha blitt eksponert for. Det ville ikke latt seg gjøre å analysere for alle miljøgifter tilstede i sedimentet. Sedimentet i Oslofjorden kan ha inneholdt andre typer PCB-kongener og PAH-er eller for eksempel dioksiner, tinnorganiske forbindelser som TBT eller metaller (se blant annet Green et al. (2005)). Disse stoffene kan potensielt ha påvirket biomarkørresultatene i de to forsøkene.

4.2.2 PAH-metabolitter

På tross av at fenantren- og pyrennivåene i den eksponerte fisken i fôringsforsøket kun hadde én verdi som var signifikant forskjellig fra dag 0 (fenantren ved dag 129), ser fenantren- og pyrenmetabolittene ut til å ha hatt en forholdsvis jevn økning utover i fôringsforsøket. Samtidig var kontrollen også tydelig jevnt lavere over tid, særlig mot slutten av forsøket. Dette viser at torsken som beitet på børstemarken fikk i seg PAH-ene akkumulert av marken. Økningen i nivået over tid kan ha to ulike plausible forklaringer. Den ene er at fenantren og pyren har akkumulert i fisken. Dersom pyren og fenantren ikke akkumulerte ville konsentrasjonen av PAH-metabolitter i gallen ha stabilisert seg over tid. PAH-er akkumulerer normalt ikke i fisk. I dette tilfellet har eksponeringen for PAH-er likevel vært såpass kontinuerlig og jevn, at fisken ikke har rukket å metabolisere alt inntak av PAH. En alternativ forklaring til akkumulering kan være enterohepatisk sirkulasjon, altså at metabolittene fra fenantren og pyren har blitt tatt opp i leveren igjen etter å ha blitt utskilt i gallen. I og med at PAH-er ikke er vanlig å spore i vevet til fisk i naturen, er dette kanskje den mest trolige forklaringen. I naturen vil PAH-eksponeringen være mer variert i og med fisken forflytter seg mellom beiteområder. Dette kan også være en forklaring på at PAH-er ikke er vanlig å spore i fiskevev. McElroy og Sisson (1989) viste at PAH-metabolitter i føden også er tilgjengelige for opptak i fisk. På tross av at *Nereis virens* metaboliserer PAH-er

effektivt (Jørgensen et al., 2005; Rust et al., 2004) får altså torsken i seg slike miljøgifter. Om metabolittene i torskens galle stammer fra nedbrytning utført av *Nereis virens* eller av torsken selv, er vanskelig å vite. Undersøkelser har likevel vist at PAH-metabolitter dannet av *Nereis virens* er mindre biotilgjengelige enn selve moderstoffet (McElroy og Sisson, 1989). Dette følger naturlig av at disse metabolittene allerede er hydrofile og i vannfase i tarmen. Det er derfor rimelig å anta at metabolittene i torsken i hovedsak stammer fra torskens egen nedbrytning.

At forskjellene mellom kontrollgruppen og eksponert gruppe, når det gjelder PAH-metabolitter i gallen, var mest markert for pyren og fenantren, både i fôringsforsøket og oppvirlingsforsøket, kan tyde på at disse er mer biotilgjengelige enn andre PAH-er. Det meget markerte innholdet av pyren i den eksponerte gruppen av *Nereis virens*, tyder på at pyren er spesielt biotilgjengelig fra sediment. Ved sammenlikning av ulike PAH-er i bentiske marine organismer, fant Ruus et al. (2005) at pyren bioakkumulerte i en større grad enn andre PAH-er. Schaanning et al. (2006) fant at pyren også lettere lekker ut fra sediment til omgivelsene enn andre PAH-er, og dermed er lettere tilgjengelig for opptak.

Den eksponerte fiskens innhold av naftalenmetabolitter i gallen var aldri signifikant forskjellig fra dag 0 og så ikke ut til å øke over tid. Lavmolekylære PAH-er fordamper lett (Soclo et al., 2000). PAH-er med to ringer skilles også raskt ut hos fisk (Varanasi et al., 1985) noe som kan være med på å forklare hvorfor det ikke er markerte mengder metabolitter i fiskens galle. Enkelte studier har tydet på at naftalen kan skilles direkte ut gjennom fiskenes gjeller eller skinn (Varanasi et al., 1978) og at naftalen metaboliseres raskere enn andre PAH-er (Lee et al., 1972). De kjemiske undersøkelsene viste at naftalen ikke var spesielt tilstedeværende i sedimentet fra indre Oslofjord. At *Nereis virens* likevel hadde tatt opp synlige mengder naftalen fra sedimentet, kan tyde på at naftalen er lett tilgjengelig for marken og at *Nereis virens* akkumulerer lavmolekylære PAH-er. Varanasi et al. (1985) fant at kamskjell, i motsetning til fisk og reker, akkumulerte lavmolekylære PAH-er. Organismers

taksonomi kan dermed muligens være en indikator på i hvilken grad akkumulering vil være en aktuell problemstilling.

Til tross for et markert nivå av benzo[a]pyren i den eksponerte børstemarken, var det ikke tydelige forskjeller mellom kontrollfiskens og den eksponerte fiskens innhold av benzo[a]pyren-metabolitter i gallen. Dette kan muligens være et resultat av at omdanningen av benzo[a]pyren i fisken går tregt, men det er mer trolig at det er analysemetodens manglende spesifisitet for benzo[a]pyren som er forklaringen. Fast fluorescensdeteksjon er praktisk for å kartlegge den generelle mengden PAH-metabolitter i en væske, men det er ikke mulig å fastslå hvilke enkeltstoffer det er snakk om (Ariese et al., 2005). Fast fluorescensdeteksjon må derfor regnes som en semikvantitativ metode (Aas et al., 1998). Ariese et al. (2005) anbefalte bruk av HPLC-Flu-metoden dersom PAH-ene det har blitt eksponert for er et resultat av forbrenning, men dette er en mer tidkrevende, omfattende og kostbar metode. Fordelen med fast fluorescensdeteksjon er at man får målt alle PAH-enes konjugater. Feltstudier har også vist at måling av PAH-metabolitters fluorescens, ved hjelp av fast fluorescensdeteksjon, normalt er en god nok metode for å skille mellom kontroll- og eksponerte områder og at forstyrrelser fra andre kilder er begrenset for denne metoden (Aas et al., 2000). På tross av at metoden brukt i dette forsøket er semikvantitativ og mindre eksakt enn andre teknikker, regnes derfor likevel resultatene i dette forsøket som en god indikasjon på den PAH-eksponeringen fiskene har vært utsatt for.

Ved dag 13 i fôringsforsøket hadde fisk både i kontrollgruppen og eksponert gruppe generelt en økning av PAH-metabolitter i gallen. I og med at verdiene igjen har sunket ved dag 26 kan resultatene tyde på at prøvene for dag 13 er kontaminerte eller at andre metodologiske artefakter har virket. Det er derfor sannsynlig at de høye verdiene ved dag 13 ikke er reelle.

At pyrennivået var spesielt høyt i *Nereis virens* viste at pyren så ut til å være spesielt biotilgjengelig og med høyt potensial til å akkumulere i marken. Dette støtter opp resultater hos Ruus et al (2005), som viste at pyren akkumulerte i en større grad i

børstemark og nettsnegl (*Nereis diversicolor* og *Hinia reticulata*) enn andre PAH-er, relativt i forhold til innholdet i sediment.

Grunnen til at naftaleninnholdet i *Nereis virens* var høyere for kontrollgruppen enn den eksponerte gruppen, kan være at fôret til marken inneholdt naftalen. Dette blir imidlertid kun spekulasjoner i og med at fôret ikke har blitt analysert.

Konsentrasjonen av naftalen i sedimentet var langt lavere enn den for fenantren og benzo[a]pyren, men dette speiles ikke i marken. Naftalen er lett biotilgjengelig i forhold til større PAH-molekyler, men dette kan neppe forklare hele innholdet i marken og i alle fall ikke at kontrollmarken har de høyeste nivåene.

4.2.3 Øvrige biomarkører

Fordi det ikke ble funnet noen signifikante forskjeller i CYP1A-nivået for den eksponerte gruppen av fisk over tid, ser det ikke ut til at CYP1A har blitt induert i dette tilfellet. Det at kontrollgruppen og den eksponerte gruppe er signifikant forskjellige ved enkelte tidspunkter, kan kanskje likevel tyde på det motsatte. Den økende tendensen til den eksponerte gruppen mot dag 66 og dag 129 kan tyde på at en induksjon har funnet sted, men resultatene er ikke klare nok til å trekke noen konklusjon. Nivået av EROD var signifikant forskjellig over tid for fisken i den eksponerte gruppen, noe som kan indikere CYP1A-induksjon. Men selv om konsentrasjonene av aryl-hydrokarbonreseptor-agonister var tydelig i den eksponerte marken var kontrollgruppen og den eksponerte gruppen av fisk aldri signifikant forskjellige på noen av tidspunktene. Gruppene følger også det samme stigende mønsteret. At kontrollgruppen i enkelte tilfeller ser ut til å ha ligget høyere enn den eksponerte gruppen, taler ikke for en induksjon hos den eksponerte gruppen i dette forsøket.

Det er godt dokumentert at opptak av PAH-er og PCB-er kan lede til induksjon av CYP1A (Hahn et al., 1993) via aryl-hydrokarbonreseptoren. Husøy et al. (1996) fant

at induksjon av CYP1A i torsk korrelerte sterkt med eksponering for sedimentbundne PAH-er. Det viser seg likevel at en eksponering for slike stoffer ikke nødvendigvis leder til noen induksjon. Noen undersøkelser har vist at tilstedeværelsen av PAH-en fluoranten kan hemme CYP1A (Willett et al., 2001). Dersom fluoranten er tilstede sammen med andre PAH-er, som benzo[a]pyren, vil metabolismen av disse PAH-ene kunne bli redusert. De kjemiske analysene viste at fluoranten var sterkt tilstedeværende i sedimentet i fôringsforsøket, og at stoffet også ble tatt opp av *Nereis virens*. Det er derfor mulig at en slik hemming av CYP1A har inntruffet i dette forsøket. Metoder som baserer seg på målinger av CYP1A-aktiviteten som en indikator på PAH-eksponering, kan derfor muligens resultere i en undervurdering av i hvilken grad fisk har vært utsatt for PAH-er.

Alle PCB-kongerene som ble analysert i dette forsøket er klorsubstituer i ortoposisjon (én eller flere). Slike PCB-er viste seg ikke å indukere CYP1A i regnbueørret (*Oncorhynchus mykiss*) (Newsted et al., 1995). Newsted et al. (1995) kunne kun påvise induksjon av CYP1A fra non-ortosubstituerte PCB-konger og mellom disse var potensialet til induksjon svært varierende. Det er derfor mulig at PCB-er tilstede i *Nereis virens* ikke har hatt potensiale til å indukere CYP1A.

Whyte et al. (2000) hevdet at majoriteten av PAH-er og PCB-er, for de fleste fiskearters vedkommende, stort sett kun har et lavt til moderat potensial til induksjon av hepatisk EROD, men at EROD er en svært sensitiv indikator på tilstedeværelse av agonister for aryl-hydrokarbonreseptoren. Forhøyet EROD-aktivitet er normalt derfor en av de første målbare tegnene på eksponering for PAH-er og PCB-er (Stegeman, 1992). Grunnen til at kontrollgruppen og den eksponerte gruppen begge viste tegn til induksjon, kan derfor være metodens følsomhet. Det burde likevel vært mulig å se en tydelig forskjell mellom den eksponerte gruppen og kontrollgruppens nivå av induksjon.

CYP1A kan hemmes av enkelte halogenerte bifenyler (Hahn et al., 1993; Newsted et al., 1995). Flere undersøkelser har vist at kombinasjoner av PCB-er også kan virke hemmende på EROD (Besselink et al., 1998; Gooch et al., 1989). Kuiper et al.

(2004) fant at kombinasjoner av polybromerte difenyletere kunne hemme induksjon av EROD i karpe (*Cyprinus carpio*). Newsted et al. (1995) viste at regnbueørret (*Oncorhynchus mykiss*) hadde en høyere induksjon av CYP1A ved eksponering for 2, 3, 7, 8- tetraklordibenzo-*p*-dioksin (TCDD) alene, enn TCDD i kombinasjon med en CYP1A-induserende PCB eller en PCB som ikke hadde vist å være CYP1A-induserende. Det er derfor mulig at kombinasjonen av miljøgifter i denne studien, kan forklare hvorfor CYP1A-nivået ikke er åpenbart stigende over tid.

Stein et al. (1992) fant at innholdet av PCB i sediment korrelerte med EROD-aktivitet i lever hos flyndre og sålefisk (*Platichthys stellatus*, *Parophrys vetulus* og *Lepidopsetta bilineata*), mens Förlin og Celanders (1995) fant at ved høye konsentrasjoner av PCB i sediment, ble EROD ikke induisert i abbor (*Perca fluviatilis*). Ruus et al. (2006) fant tilsynelatende ingen induksjon i EROD-aktivitet i torsk (*Gadus morhua*) utsatt for høye nivåer av PCB-forurensning, Kennedy et al. (2003) fant at EROD og PCB-konsentrasjonen ikke var korrelert i gråmåke (*Largus argentatus*), selv om CYP1A var signifikant assosiert med det totale innholdet av PCB. En annen mulig forklaring på at kontrollgruppen og den eksponerte gruppen ikke var forskjellige, og at det ikke var noen korrelasjon mellom CYP1A og EROD kan derfor muligens være forklart av en hemming av CYP1A-relaterte prosesser. Gooch et al. (1989) fant at hemming av EROD ikke alltid korrelerte med en nedgang i induksjon av CYP mRNA i brasme (*Stenotomus chrysops*), noe som indikerer at nedgang av EROD kan være et resultat av nedgang i selve den katalytiske effekten til CYP (Kuiper et al., 2004). Dette kan blant annet være forårsaket av at hepatotoksisitet har ledet til en generell svekking av metabolismen av fremmedstoffer (Gooch et al., 1989). Forholdet mellom CYP1A og EROD ser altså ut til å være komplisert. Selv om det er et tydelig innhold av PCB og PAH-er i fisken er det ikke nødvendigvis mulig å spore en tydelig økning av CYP1A og EROD.

En rekke faktorer har vist seg å spille inn på metabolismen av fremmedstoffer hos fisk. Blant annet temperatur, alder og kjønn kan påvirke aktiviteten til leverenzymmer (Kleinow et al., 1987). I begge disse forsøkene var fiskene juvenile og fiskene innad i

forsøkene like gamle. Det var ikke vesentlige forskjeller i temperatur eller salinitet under forsøkene.

Siden det ikke var mulig å se noen forskjeller i tendensen hos kontrollfisker og den eksponerte fiskens vitellogeninnivå (VTG), ser det ikke ut til VTG har blitt induisert i den eksponerte fisken. Dette var altså på tross av at innholdet av potensielt østrogene stoffer som PCB-138 og PCB-153 (Bonefeld-Jorgensen et al., 2001) var nesten 3 ganger høyere i den eksponerte marken enn i kontrollmarken og tydelig tilstede i fiskenes lever. Verdiene for vitellogenin lå svært nær deteksjonsgrensen, noe som gjør det vanskelig å se noen klare forskjeller i dataene. Dette kan ha forårsaket at forskjeller vitellogeninnivået i fiskene ikke har blitt oppdaget.

I og med at den eksponerte fiskens zona radiata protein (ZRP)-nivåer aldri var signifikant forskjellige fra dag 0 var det ikke berettiget å konkludere med at en induksjon hadde funnet sted. Ut fra mønsteret i kurvene for kontrollfisker og den eksponerte fisken og det at kontrollen var signifikant forskjellig fra den eksponerte fisken ved dag 129, kan det likevel tyde på at den eksponerte fisken har hatt en økning i nivået av ZRP over tid. Oppen-Berntsen et al (1999) viste at ZRP hadde en høyere grad av induksjon i juvenil atlantehavslaks (*Salmo salar*) ved behandling med lave konsentrasjoner av 4-nonylfenol enn det tilsvarende for VTG. Arukwe et al (2000) viste at ZRP var en mer sensitiv biomarkør enn VTG hos den samme arten. Resultatene i denne studien kan bidra til å underbygge teorien om at ZRP kan være en mer følsom biomarkør for eksponering for østrogene stoffer enn VTG.

4.3 Oppvirvlingsforsøket

Torsk ble eksponert for sediment fra indre Oslofjord eller sedimentfrie omgivelser i maks 129 dager. Ved hver prøvetakning ble det tatt prøver av galle og lever.

Analysen av PCB i leveren viste at PCB akkumulerte over tid, i noen tilfeller også i kontrollgruppen. PAH-metabolittene i gallen så ut til å øke raskt for noen PAH-er for deretter å avta over tid.

4.3.1 Akkumulering

Opptaket av PCB-er med høy kloreringsgrad, som PCB-138 og PCB 153, fra sedimentet så ut til å være omtrent lik for kontrollen som for eksponert gruppe hos fiskene i oppvirvlingsforsøket. Gruppene var aldri signifikant forskjellige for disse PCB-ene. For mer flyktige PCB-er, som PCB-28 og PCB-52, økte konsentrasjonen i den eksponerte fiskens lever betraktelig mer enn det tilsvarende for kontrollen. Det ble også funnet signifikante forskjeller over tid mellom eksponert fisk og kontrollfisk. Denne forskjellen i akkumulering tyder på at enkelte PCB-er er mer tilgjengelige for opptak via oppvirvlet sediment enn andre. Dette kan kanskje være forårsaket av at PCB-er med lav kloreringsgrad har mindre partikkelbinding enn de høymolekylære. Det har seg likevel slik at de høymolekylære PCB-ene er mer fettløselige og teoretisk sett burde det derfor vært en markert forskjell mellom kontrollgruppen og den eksponerte fisken. Hvorfor dette ikke var tilfellet kan imidlertid forklares med at fiskens fôr også inneholdt synlige mengder av blant annet PCB-138 og PCB-153 (se vedlegg under analyser av PCB i lever for oppvirvlingsforsøket).

Ekstrapolering av PCB-nivået til det som finnes i leveren til fisk i indre deler av Oslofjorden, viste at fisken i oppvirvlingsforsøket ville brukt 14-18 år for å komme på dette nivået. Denne beregningen var ment som et forsøk på å si noe om viktigheten av oppvirvlet sediment for PCB-eksponering, og det ble ikke justert for økt vekt og fødeopptak med tiden. I følge disse beregningene ville det tatt omtrent 6 ganger så lang tid for fiskene i oppvirvlingsforsøket å nå nivået av PCB-7, til fisk i indre Oslofjord, sammenliknet med fiskene i fôringsforsøket. Sedimentet i oppvirvlingsforsøket hadde rundt en 3-del av innholdet av PCB-7 som sedimentet i fôringsforsøket (fra indre fjord). Likevel var disse resultatene med på å understreke betydningen av opptaksvei for biotilgjengelighet. I naturen kan torsk bli omlag 15-20 år gamle. Oppvirvlet sediment alene ser i denne sammenheng derfor ikke ut til å være den mest sentrale kilden til PCB for torsk i Oslofjorden.

4.3.2 PAH-metabolitter

Grunnen til at andelen metabolitter i torskens galle i oppvirvlingsforsøket ser ut til å ha økt hurtig, kan være at oppvirvlingen av sedimentet har gjort PAH-ene raskt tilgjengelige for opptak. Særlig for pyren og fenantren er økningen av metabolitter i gallen hos den eksponerte fisken umiddelbar, noe som tyder på at disse PAH-ene er lett biotilgjengelige fra oppvirvlet sediment. Goksøyr et al (1994) viste at PAH-er raskt akkumulerte fra sedimentet til stasjonær torsk.

Konsentrasjonene av metabolitter i gallen sank ganske tidlig i forsøket. Dette kan komme av at PAH-ene i det mest finpartikulære sedimentet har blitt vasket ut, og at det derfor ikke er mer tilgjengelige PAH-er. I løpet av forsøket ble store deler av sedimentet vasket ut av fiskenes tanker. Dette kom som en naturlig følge av at sedimentet ble virvlet opp i 4 måneder og at kravet til vanngjennomstrømning var stort. Nedgangen av i PAH-metabolitter kan derfor også ha vært forårsaket av det var mindre sediment i tankene mot slutten av forsøket.

At metabolittnivået for samtlige PAH-er ser ut til å øke fra dag 66 til dag 97, etter å ha avtatt, kan muligens bero på at sedimentet ikke har vært skikkelig homogenisert, slik at konsentrasjonen av PAH-er har vært høyere lenger nede i sedimentet. En annen forklaring kan være at sedimentet lenger nede bestod av finere partikler.

Det er lite sannsynlig at torsk i naturen blir utsatt for en så kontinuerlig eksponering for oppvirvlet sediment som i dette forsøket. Det er derfor ikke mulig å trekke noen direkte sammenlikning til eksponeringen torsken utsettes for i indre Oslofjord, men forsøket gir et godt bilde på hvor tilgjengelige miljøgiftene generelt er. Andelen frie partikler i vannet ble ikke målt, og det er derfor vanskelig å vite om oppvirvlingsgraden samsvarer med andelen frie partikler i vannet i indre Oslofjord.

4.4 Sammenlikning av resultater i oppvirvlingsforsøket og fôringsforsøket

At *Nereis virens* metaboliserer PAH-er kan være noe av forklaringen på hvorfor konsentrasjonen av PAH-metabolitter i gallen hos fisken i oppvirvlingsforsøket generelt var høyere enn hos fisken i fôringsforsøket. Innholdet for eksempel av pyren i sedimentet, fra indre fjord i fôringsforsøket, var omtrent 1100 µg/kg mens konsentrasjonen i *Nereis virens* kun var på cirka 30 µg/kg. Dette var trolig i stor grad forårsaket av børstemarkenes metabolisme. Fiskene i fôringsforsøket vil derfor totalt ha hatt en lavere eksponeringsgrad for PAH-er. Dette taler for at PAH-er vil være mindre biotilgjengelige for torsk via PAH-metaboliserende bentiske dyr, enn via utlekking fra sediment. Cornelissen et al. (2006) viste at PAH-er var mer biotilgjengelig i sedimentets porevann enn ved utlekking fra sedimentet, fordi konsentrasjonen i porevannet samsvarte mer med den biotilgjengelige konsentrasjonen i sedimentet. Dermed vil *Nereis virens*, som lever i ganger i sedimentet, kunne ta opp PAH-er mer effektivt enn det torsken gjør via PAH-utlekking fra sedimentet. Dette veier for at bentisk føde vil være en viktigere kilde til PAH-er for torsken, enn direkte utlekking fra sedimentet. Siden konsentrasjonen av PAH-metabolitter generelt var høyere i fisken fra oppvirvlingsforsøket enn i fôringsforsøket kan det likevel tyde på at PAH-er er lettere tilgjengelig for fisk fra oppvirvlet sediment enn fra føden. Dersom sedimentet ikke hadde blitt vasket ut kunne muligens konsentrasjonen av PAH-er ha fortsatt å stige etter dag 26 i oppvirvlingsforsøket.

I oppvirvlingsforsøket økte konsentrasjonen i leveren av PCB-138 og PCB-153 både hos kontrollfiskene og de eksponerte fiskene. Den samme tendensen ble ikke konstatert i fiskene i fôringsforsøket. Dette kan komme av at disse kongerene ikke er så tilgjengelige fra sedimentet via utlekking, muligens på grunn av høy partikkelaaffinitet. Børstemarken har imidlertid sannsynlig vis fått i seg kongerene 138 og 153 via porevannet, eller ved beiting på sedimentet, og har ved dette gjort dem tilgjengelige for opptak i torsken. På tross av at konsentrasjonen av PCB i *Nereis*

virens lå noe over konsentrasjonen av PCB i sedimentet i oppvirvlingsforsøket, kan man dermed muligens konkludere med at føden er en viktigere og mer omfattende kilde til PCB i fisk.

4.5 Forsøksdesign

Spesielt i forsøk med dyr er det viktig å være nøye med å velge et tilstrekkelig antall replikater slik at gjentakning av forsøk ikke blir nødvendig. Det kan bemerkes at antallet replikater ikke har vært ideelt i forsøkene i denne masteroppgaven. Tre fisker per prøvetakning gir ikke spesielt stor teststyrke. I de tilfellene hvor antallet fisk har blitt redusert ytterligere, av mangel på galle eller på grunn av feil ved analysen, var det særlig vanskelig å utføre gode statistiske beregninger. Av praktiske årsaker på grunn av logistikk, som blant annet plassmangel, var det ikke mulig å holde flere fisk i de to forsøkene. Økning med kun én ekstra fisk per prøvetakning ville vært for ressurskrevende. Mangelen på replikater kan potensielt ha ledet til type II-feil. Det vil si at virkelige forskjeller mellom grupper ikke har blitt oppdaget. Ved dag 0 og 129 (og dag 66 i oppvirvlingsforsøket), var antallet replikater høyere enn for de øvrige tidspunktene for prøvetaking. Grunnlaget for sammenlikning grupper imellom, var derfor noe bedre ved disse tidspunktene.

5. Konklusjoner

I denne oppgaven har det blitt vist at juvenil torsk akkumulerer miljøgifter fra sediment via føde (børstemarken *Nereis virens*), men også direkte fra oppvirvlet sediment, etter kronisk eksponering. Det har også blitt vist at miljøgifter fra sediment påvirker juvenil torsk, i alle fall når det gjelder andelen PAH-metabolitter i gallen. Begge null-hypotesene for denne oppgaven ble dermed forkastet.

Juvenil torsk eksponert for miljøgifter via *Nereis virens* viste seg å akkumulere PCB i leveren fra oppvirvlet sediment og levernivået øket over tid. Fordi fisken i oppvirvlingsforsøket var eksponert for PCB gjennom industrielt produsert fôr, var det vanskelig å konkludere eksakt med hvilke typer PCB-er som var biotilgjengelige for torsken via oppvirvlet sediment. Resultatene tydet likevel på at PCB-er med lav kloreringsgrad akkumulerer lettere enn mer fettløselige PCB-er med høy partikkelaffinitet. Juvenil torsk viste seg også å akkumulere PCB-er i leveren via *Nereis virens*. Innholdet i leveren økte over tid og det var gjerne en 3-dobling hos den eksponerte fisken i fôringsforsøket i slutten av forsøket. For juvenil torsk eksponert for PCB-er via føden var det en tydelig økning for samtlige undersøkte kongenerer over tid, hos den eksponerte fisken. Kontrollfiskens nivåer holdt seg stabilt lave. Dette tyder på at føden kan være en viktigere kilde til PCB-er i torsk enn oppvirvlet sediment.

Det ble funnet forhøyde nivåer at PAH-metabolitter i galle hos juvenil torsk eksponert for miljøgifter fra oppvirvlet sediment. I fiskene i oppvirvlingsforsøket var økningen av pyren- og fenantrenmetabolitter i gallen umiddelbar, men nivåene sank deretter raskt igjen. Torsken som ble eksponert for miljøgifter via føden, hadde en markert økning i fenantren- og pyrenmetabolitter i gallen, særlig mot slutten av forsøket. Disse resultatene tyder på at begge eksponeringsveier er viktige for opptak av PAH-metabolitter i juvenil torsk.

Eksponering av juvenil torsk for miljøgifter via føde førte til endringer i levernivåer

av både CYP1A og EROD over tid. EROD-nivået hos den eksponerte fisken var signifikant forskjellig fra dag 0 ved slutten av forsøket, noe som tyder på at EROD kan ha blitt induisert. Men fordi fiskene i kontrollgruppen aldri var signifikant forskjellig fra den eksponerte gruppen, blir det likevel vanskelig å konkludere med at en induksjon av EROD og CYP1A har funnet sted i denne studien.

Det ble ikke funnet noen endringer i plasmanivåer av vitellogenin i juvenil torsk eksponert for miljøgifter via føde. Det var heller ingen tydelig forandring over tid i nivået av zona radiata-protein. ZRP-nivået økte noe over tid i den eksponerte gruppen av fisk, men dette var ikke betraktelig nok til å konkludere med at en induksjon har funnet sted. Resultatene antydte likevel at ZRP muligens er en bedre biomarkør for eksponering for hormonhermende stoffer enn VTG.

Flerbørstemarken *Nereis virens* viste seg å akkumulere både PCB og PAH-er ved kronisk eksponering for miljøgifter i sediment. Graden av akkumulering varierte mellom ulike former for PAH-er og PCB-er og det var tydelig at det var en høy grad av variasjon i biotilgjengeligheten til slike stoffer.

Det var vanskelig å fastslå i hvor stor grad resultatene i dette prosjektet er relevante i forhold til torsk i naturen. I fjorder og hav vil torsk stadig forflytte seg og graden av eksponering av miljøgifter vil variere kontinuerlig. Resultatene i studien viste likevel at oppvirvling av forurensede sedimenter, for eksempel som følge av båttrafikk, bør begrenses, slik at miljøgifter potensielt blir mindre biotilgjengelige for fisk.

Generelt vil det være de øverste lagene av sedimentet som er tilgjengelige for bunnlevende dyr. Fordi miljøgifter i sedimenter har vist seg å være tilgjengelige for torsk via børstemark, vil det kunne være fornuftig å fjerne og/eller dekke til områder med forurenset sediment med renere sedimentmasser. Det kunne også være interessant å undersøke forskjellige materialer, som for eksempel ulike typer karbon, for absorpsjon av miljøgifter. Kanskje kan tilsetting av slike materialer til sedimenter være en mulig løsning for å begrense opptak av miljøgifter i bentiske dyr og i fisk.

Videre for denne studien kunne det være interessant å beregne opptakseffektiviteten av miljøgifter fra mark til torsk ut fra hvor mye den enkelte torsk har spist. Det kunne også vært interessant å kvantifisere biomarkører for metaller slik som ALA-D eller metallotionein for å avdekke en eventuell eksponering for metaller. Ved gjentakelse av tilsvarende forsøk vil det anbefales å øke antall replikater per prøvetakning og heller redusere antall dager for prøvetakning. På denne måten vil dataene få en sterkere teststyrke. Det ville også være interessant å undersøke opptak av miljøgifter i fisk fra bentiske dyr som ikke metaboliserer.

Biotilgjengeligheten til miljøgifter i sedimenter påvirkes av flere faktorer. Det er vanskelig å konkludere med graden av biotilgjengelighet for miljøgifter i sedimenter direkte ut fra innholdet av slike gifter. Fordi marine organismer utgjør en stor industri og viktig føde for oss mennesker og andre dyr, er det sentralt å forstå mekanismene bak bioakkumulering og å bruke denne kunnskapen i forvaltning av våre marine ressurser.

Referanser

- Aas, E., J. Beyer og A. Goksoyr. 1998. PAH in fish bile detected by fixed wavelength fluorescence. *Marine Environmental Research* 46: 225-228.
- Aas, E., J. Beyer og A. Goksoyr. 2000. Fixed wavelength fluorescence (FF) of bile as a monitoring tool for polyaromatic hydrocarbon exposure in fish: an evaluation of compound specificity, inner filter effect and signal interpretation. *Biomarkers* 5: 9 - 23.
- Anulacion, B. F., B. D. Bill og T. K. Collier. 1997. Stability of cytochrome P4501A-associated enzyme activity in cryogenically stored teleost liver samples. *Chemosphere* 34: 2029-2039.
- Ariese, F., J. Beyer, G. Jonsson, C. P. Visa og M. M. Kahn. 2005. Review of analytical methods for determining metabolites of polycyclic aromatic compounds (PACs) in fish bile ICES Techniques in Marine Environmental Sciences 39: 41.
- Arukwe, A., T. Celius, B. T. Walther og A. Goksoyr. 2000. Effects of xenoestrogen treatment on zona radiata protein and vitellogenin expression in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquatic Toxicology* 49: 159-170.
- Arukwe, A. og A. Goksøyr. 2003. Eggshell and egg yolk proteins in fish: hepatic proteins for the next generation: oogenetic, population, and evolutionary implications of endocrine disruption *Comparative Hepatology* 2.
- Arukwe, A., F. R. Knudsen og A. Goksøyr. 1997. Fish Zona Radiata (Eggshell) Protein: A Sensitive Biomarker for Environmental Estrogens. *Environmental Health Perspectives* 105: 418-422.
- Barton, B. A. 2002. Stress in Fishes: A Diversity of Responses with Particular Reference to Changes in Circulating Corticosteroids. *Integrative and Comparative Biology* 42: 517-525.
- Bend, J. R., M. O. James og P. M. Dansette. 1977. IN VITRO METABOLISM OF XENOBIOTICS IN SOME MARINE ANIMALS*. *Annals of the New York Academy of Sciences* 298: 505-521.
- Besselink, H. T., M. S. Denison, M. E. Hahn, S. I. Karchner, A. D. Vethaak, J. H. Koeman og A. Brouwer. 1998. Low Inducibility of CYP1A Activity by Polychlorinated Biphenyls (PCBs) in Flounder (*Platichthys flesus*): Characterization of the Ah Receptor and the Role of CYP1A Inhibition. *Toxicological Sciences* 43: 161-171.
- Beyer, J., R. K. Bechmann, I. C. Taban, E. Aas, W. Reichert, E. Seljeskog og S. Sanni. 2001. Biomarker measurements in long term exposures of a model fish to produced water components (PAHs and alkylphenols) Akvamiljø Report AM-01/007: 28 sider.
- Beyer, J., M. Sandvik, K. Hylland, E. Fjeld, E. Egaas, E. Aas, J. U. Skare og A. Goksøyr. 1996. Contaminant accumulation and biomarker responses in flounder (*Platichthys flesus* L.) and Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) exposed by caging to polluted sediments in Sør fjorden, Norway. *Aquatic Toxicology* 36: 75-98.
- Bonefeld-Jorgensen, E. C., H. R. Andersen, T. H. Rasmussen og A. M. Vinggaard. 2001. Effect of highly bioaccumulated polychlorinated biphenyl congeners on estrogen and androgen receptor activity. *Toxicology* 158: 141-153.

- Burke, D. og R. T. Mayer. 1974. ETHOXYRESORUFIN: DIRECT FLUORIMETRIC ASSAY OF A MICROSOMAL O-DEALKYLATION WHICH IS PREFERENTIALLY INDUCIBLE BY 3-METHYLCHOLANTHRENE. *Drug Metabolism and Disposition* 2: 583-588.
- Celander, M. og L. Förlin. 1991. Catalytic activity and immunochemical quantification of hepatic cytochrome P-450 in β -naphthoflavone and isosafrol treated rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Physiology and Biochemistry* 9: 189-197.
- Ciarelli, S., N. M. van Straalen, V. A. Klap og A. P. van Wezel. 1999. EFFECTS OF SEDIMENT BIOTURBATION BY THE ESTUARINE AMPHIPOD COROPHIUM VOLUTATOR ON FLUORANTHENE RESUSPENSION AND TRANSFER INTO THE MUSSEL (*MYTILUS EDULIS*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 18: 318-328.
- Cornelissen, G., G. D. Breedveld, K. Næs, A. M. P. Oen og A. Ruus. 2006. BIOACCUMULATION OF NATIVE POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBONS FROM SEDIMENT BY A POLYCHAETE AND A GASTROPOD: FREELY DISSOLVED CONCENTRATIONS AND ACTIVATED CARBON AMENDMENT. *Environmental Toxicology and Chemistry* 25: 2349-2355.
- Cornelissen, G., O. Gustafsson, T. D. Bucheli, M. T. O. Jonker, A. A. Koelmans og P. C. M. vanNoort. 2005. Extensive Sorption of Organic Compounds to Black Carbon, Coal, and Kerogen in Sediments and Soils: Mechanisms and Consequences for Distribution, Bioaccumulation, and Biodegradation. *Environmental Science & Technology* 39: 6881-6895.
- Dignam, J. D. og P. D. Murray. 1990. Preparation of extracts from higher eukaryotes. *Methods Enzymol* 182: 194-203.
- Doumas, B. T., B. Perry, B. Jendrzczak og L. Davis. 1987. Measurement of direct bilirubin by use of bilirubin oxidase [published erratum appears in *Clinical Chemistry* 1988 Jan;34(1):207]. *Clinical Chemistry* 33: 1349-1353.
- Driscoll, S. K. og A. E. McElroy. 1996. BIOACCUMULATION AND METABOLISM OF BENZO[a]PYRENE IN THREE SPECIES OF POLYCHAETE WORMS. *Environmental Toxicology and Chemistry* 15: 1401-1410.
- Dunnett, C. W. 1955. A Multiple Comparison Procedure for Comparing Several Treatments with a Control. *Journal of the American Statistical Association* 50: 1096-1121.
- Eggleton, J. og K. V. Thomas. 2004. A review of factors affecting the release and bioavailability of contaminants during sediment disturbance events. *Environment International* 30: 973-980.
- EnglishNature. 2004. Evaluation of potential use of biomarkers as long-term monitoring tools in assessing ecological quality in terrestrial and aquatic environments of the UK. *English Nature Research Reports* 593: 27 sider.
- Ernst, W., H. Goerke og K. Weber. 1977. Fate of ^{14}C -labelled di-, tri- and pentachlorobiphenyl in the marine annelid *Nereis virens* II. Degradation and faecal elimination. *Chemosphere* 6: 559-568.
- Fisher, R. 1953. Dispersion on a Sphere. *Proceedings of the Royal Society of London. Series A, Mathematical and Physical Sciences* (1934-1990) 217: 295-305.
- Fowler, S. W., G. G. Polikarpov, D. L. Elder, P. Parsi og J. P. Villeneuve. 1978. Polychlorinated biphenyls: Accumulation from contaminated sediments and water by the polychaete *Nereis diversicolor*. *Marine Biology* 48: 303-309.
- Fries, G. F., G. S. Marrow og C. J. Somich. 1989. Oral bioavailability of aged polychlorinated biphenyl residues contained in soil. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 43: 683-690.

- Förlin, L. og M. Celander. 1995. Studies of the inducibility of P450 1A in perch from the PCB-contaminated Lake Jarnsjön in Sweden. *Marine Environmental Research* 39: 85-88.
- Ghosh, U., J. S. Gillette, R. G. Luthy og R. N. Zare. 2000. Microscale Location, Characterization, and Association of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons on Harbor Sediment Particles. *Environmental Science & Technology* 34: 1729-1736.
- Goksøyr, A., J. Beyer, A.-M. Husoy, H. E. Larsen, K. Westrheim, S. Wilhelmsen og J. Klungsoyr. 1994. Accumulation and effects of aromatic and chlorinated hydrocarbons in juvenile Atlantic cod (*Gadus morhua*) caged in a polluted fjord (Sørfjorden, Norway). *Aquatic Toxicology* 29: 21-35.
- Gooch, J. W., A. A. Elskus, P. J. Kloepper-Sams, M. E. Hahn og J. J. Stegeman. 1989. Effects of ortho- and non-ortho-substituted polychlorinated biphenyl congeners on the hepatic monooxygenase system in scup (*Stenotomus chrysops*). *Toxicology and Applied Pharmacology* 98: 422-433.
- Green, N. W., A. Ruus, Å. Bakketun, J. Håvardstun, Å. G. Rogne, M. Schøyen, L. Tveiten og Ø. Sigurd. 2005. Joint Assessment and Monitoring Programme (JAMP). National Comments regarding the Norwegian Data for 2005. (Norwegian State Pollution Monitoring Programme. Report no. 974/2006. TA-no. 2214/2006).
- Hahn, M. E., T. M. Lamb, M. E. Schultz, R. M. Smolowitz og J. J. Stegeman. 1993. Cytochrome P4501A induction and inhibition by 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl in an Ah receptor-containing fish hepatoma cell line (PLHC-1). *Aquatic Toxicology* 26: 185-208.
- Heintz, R. A., S. D. Rice, A. C. Wertheimer, R. F. Bradshaw, F. P. Thrower, J. E. Joyce og J. W. Short. 2000. Delayed effects on growth and marine survival of pink salmon *Oncorhynchus gorbuscha* after exposure to crude oil during embryonic development. *Marine Ecology. Progress Series* 208: 205-216.
- Husøy, A.-M., M. S. Myers og A. Goksoyr. 1996. Cellular localization of cytochrome P450 (CYP1A) induction and histology in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) and European flounder (*Platichthys flesus*) after environmental exposure to contaminants by caging in Sørfjorden, Norway. *Aquatic Toxicology* 36: 53-74.
- Hylland, K., O. Ø. Aspholm, J. A. Knutsen og A. Ruus. 2006. Biomarkers in fish from dioxin-contaminated fjords. *Biomarkers* 11: 97-117.
- Hylland, K. og C. Haux. 1997. Effects of environmental oestrogens on marine fish species. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 16: 606-612.
- Jørgensen, A., A. M. B. Giessing, L. J. Rasmussen og O. Andersen. 2005. Biotransformation of the polycyclic aromatic hydrocarbon pyrene in the marine polychaete *Nereis virens*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 24: 2796-2805.
- Kanapathipillai, P., E. Berg, J. Dos Santos, B. Gulliksen og T. Pedersen. 1994. The food consumption of cod, *Gadus morhua* L., in a high-latitude enhancement area. *Aquaculture and fisheries management* 25, Suppl., 1: 65-76.
- Kennedy, S. W., G. A. Fox, S. P. Jones og S. F. Trudeau. 2003. Hepatic EROD Activity is Not a Useful Biomarker of Polychlorinated Biphenyl Exposure in the Adult Herring Gull (*Larus argentatus*). *Ecotoxicology* 12: 153-161.
- Kime, D. E. 1995. The effects of pollution on reproduction in fish. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 5: 52-95.
- Kleinow, K. M., M. J. Melancon og J. J. Lech. 1987. Biotransformation and Induction: Implications for Toxicity, Bioaccumulation and Monitoring of Environmental Xenobiotics in Fish. *Environmental Health Perspectives* 71: 105-119.

- Koelmans, A. A., M. T. O. Jonker, G. Cornelissen, T. D. Bucheli, P. C. M. Van Noort og O. Gustafsson. 2006. Black carbon: The reverse of its dark side. *Chemosphere* 63: 365-377.
- Konieczny, R. 1999. Miløgiftundersøkesle i Indre Oslofjord. Delrapport 4. NIVA-Rapport, Delrapport . Miljøgifter i sedimenter, L-nr: OR-3094: 89 sider.
- Kristensen, E. 1984. Life cycle, growth and production in estuarine populations of the polychaetes *Nereis virens* and *N. diversicolor*. *Ecography* 7: 249-250.
- Kruskal, W. H. og W. A. Wallis. 1953. Errata: Use of Ranks in One-Criterion Variance Analysis. *Journal of the American Statistical Association* 48: 907-911.
- Kuiper, R. V., A. Bergman, J. G. Vos og M. van den Berg. 2004. Some polybrominated diphenyl ether (PBDE) flame retardants with wide environmental distribution inhibit TCDD-induced EROD activity in primary cultured carp (*Cyprinus carpio*) hepatocytes. *Aquatic Toxicology* 68: 129-139.
- Larsson, P. 1985. Contaminated sediments of lakes and oceans act as sources of chlorinated hydrocarbons for release to water and atmosphere. *Nature* 317: 347-349.
- Lee, H., B. L. Boese, J. Pelletier, M. Winsor, D. T. Specht og R. C. Randall. 1991. Guidance manual: bedded sediment bioaccumulation tests. EPA/600/x-89/302.: 163 sider.
- Lee, R. F., R. Sauerheber og G. H. Dobbs. 1972. Uptake, metabolism and discharge of polycyclic aromatic hydrocarbons by marine fish. *Marine Biology* 17: 201-208.
- Leppanen, M. T. og J. V. K. Kukkonen. 1998. Relative Importance of Ingested Sediment and Pore Water as Bioaccumulation Routes for Pyrene to Oligochaete (*Lumbriculus variegatus*, Müller). *Environmental Science & Technology* 32: 1503-1508.
- Leppanen, M. T. og J. V. K. Kukkonen. 2000. Effect of sediment-chemical contact time on availability of sediment-associated pyrene and benzo[a]pyrene to oligochaete worms and semi-permeable membrane devices. *Aquatic Toxicology* 49: 227-241.
- Levene, H., I. Olkin, S. G. Ghurye, W. Hoeffding, W. G. Madow og H. B. e. Mann. 1960. Robust tests for equality of variances. *Contributions to probability and statistics* Stanford University Press , Stanford: 278-292.
- Lin, E. L. C., S. M. Cormier og J. A. Torsella. 1996. Fish Biliary Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Metabolites Estimated by Fixed-Wavelength Fluorescence: Comparison with HPLC-Fluorescent Detection. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 35: 16-23.
- Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr og R. J. Randall. 1951. PROTEIN MEASUREMENT WITH THE FOLIN PHENOL REAGENT. *Journal of Biological Chemistry* 193: 265-275.
- Mackay, D. og A. Fraser. 2000. Bioaccumulation of persistent organic chemicals: mechanisms and models. *Environmental Pollution* 110: 375-391.
- Mann, H. B. og D. R. Whitney. 1947. On a Test of Whether one of Two Random Variables is Stochastically Larger than the Other. *The Annals of Mathematical Statistics* 18: 50-60.
- Matsubara, T., N. Ohkubo, T. Andoh, C. V. Sullivan og A. Hara. 1999. Two Forms of Vitellogenin, Yielding Two Distinct Lipovitellins, Play Different Roles during Oocyte Maturation and Early Development of Barfin Flounder, *Verasper moseri*, a Marine Teleost that Spawns Pelagic Eggs. *Developmental Biology* 213: 18-32.
- McElroy, A. E. 1985. In vivo metabolism of benz[a]anthracene by the polychaete *Nereis virens*. *Marine Environmental Research* 17: 133-136.
- McElroy, A. E. 1990. Polycyclic aromatic hydrocarbon metabolism in the polychaete *Nereis virens* *Aquatic Toxicology* 18: 35-50.

- McElroy, A. E., J. W. Farrington og J. M. Teal. 1990. Influence of mode of exposure and the presence of a tubiculous polychaete on the fate of benz[a]anthracene in the benthos. *Environmental Science & Technology* 24: 1648-1655.
- McElroy, A. E. og J. D. Sisson. 1989. Trophic transfer of benzo[a]pyrene metabolites between benthic marine organisms. *Marine Environmental Research* 28: 265-269.
- McLeese, D. W., C. D. Metcalfe og D. S. Pezzack. 1980. Uptake of PCBs from sediment by *Nereis virens* and *Crangon septemspinosa*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 9: 507-518.
- Neff, J. M. 1984. Bioaccumulation of organic micropollutants from sediments and suspended particulates by aquatic animals. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry* 319: 132-136.
- Newsted, J. L., J. P. GIESY, G. T. Ankley, D. E. Tillitt, R. A. Crawford, J. W. Gooch, P. D. Jones og M. S. Denison. 1995. DEVELOPMENT OF TOXIC EQUIVALENCY FACTORS FOR PCB CONGENERS AND THE ASSESSMENT OF TCDD AND PCB MIXTURES IN RAINBOW TROUT. *Environmental Toxicology and Chemistry* 14: 861-871.
- Nicolas, J.-M. 1999. Vitellogenesis in fish and the effects of polycyclic aromatic hydrocarbon contaminants. *Aquatic Toxicology* 45: 77-90.
- Olsgard, F. 1995. Overvåkning av forurensningssituasjonen i Indre Oslofjord: undersøkelser av bløtbunnsfauna 1993. Statlig program for forurensningsovervåkning. Rapport. 622/95.
- Oppen-Berntsen, D. O., A. Arukwe, F. Yadetie, J. B. Lorens og R. Male. 1999. Salmon Eggshell Protein Expression: A Marker for Environmental Estrogens. *Marine Biotechnology* 1: 252-260.
- Palmqvist, A., L. J. Rasmussen og V. E. Forbes. 2006. Influence of biotransformation on trophic transfer of the PAK fluoranthene. *Aquatic Toxicology* 80: 309-319.
- Parkinson, A. 2003. Biotransformation of xenobiotics. In: Klaassen, Curtis D, Watkins, John B. Cassaret and Doull's *Essentials of Toxicology*: 71-97.
- Peakall, D. B. 1994. The role of biomarkers in environmental assessment (1). Introduction. *Ecotoxicology* 3: 157-160.
- Pruell, R., N. Rubinstein, B. Taplin, J. LiVolsi og R. Bowen. 1993. Accumulation of polychlorinated organic contaminants from sediment by three benthic marine species. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 24: 290-297.
- Reynoldson, T. B. 1987. Interactions between sediment contaminants and benthic organisms. *Hydrobiologia* 149: 53-66.
- Ross, P. S. og L. S. Birnbaum. 2003. Integrated Human and Ecological Risk Assessment: A Case Study of Persistent Organic Pollutants (POPs) in Humans and Wildlife. *Human and Ecological Risk Assessment* 9: 303 - 324.
- Rubinstein, N. I., E. Lores og N. R. Gregory. 1983. Accumulation of PCBs, mercury and cadmium by *Nereis virens*, *Mercenaria mercenaria* and *Palaemonetes pugio* from contaminated harbor sediments. *Aquatic Toxicology* 3: 249-260.
- Rust, A. J., R. M. Burgess, B. J. Brownawell og A. E. McElroy. 2004. Relationship between metabolism and bioaccumulation of benzo[a]pyrene in benthic invertebrates. *Environmental Toxicology and Chemistry* 23: 2587-2593.
- Ruus, A. og N. W. Green. 2005. Statlig program for forurensningsovervåkning. Overvåkning av miljøforholdene i Sørfjorden 2004. Delrapport 3. Miljøgifter i organismer. Rapport no. 938. TA-no: 2123/2005. 191 sider.
- Ruus, A., N. W. Green, A. Maage og J. Skei. 2006. PCB-containing paint and plaster caused extreme PCB-concentrations in biota from the Sørfjord (Western Norway)--A case study. *Marine Pollution Bulletin* 52: 100-103.

- Ruus, A., K. Hylland og N. W. Green. 2003. Joint Assessment and Monitoring Programme (JAMP). Biological Effects Methods, Norwegian Monitoring 1997-2001 Norwegian State Pollution Monitoring Programme Report no. 869/03. TA-no. 1948/2003.
- Ruus, A., M. Schaanning, S. Øxnevad og K. Hylland. 2005. Experimental results on bioaccumulation of metals and organic contaminants from marine sediments. *Aquatic Toxicology* 72: 273-292.
- Ruus, A., J. Utne Skaare og K. Ingebrigtsen. 2001. DISPOSITION AND DEPURATION OF LIDANE (γ -HCH) AND POLYCHLORINATED BIPHENYL-110 (2,3,3', 4', 6-PENTACHLOROBIPHENYL) IN COD (*GADUS MORHUA*) AND BULLROT (*MYOXOCEPHALUS SCORPIUS*) AFTER SINGLE ORAL EXPOSURES. *Environmental Toxicology and Chemistry* 20: 2377-2382.
- Schaanning, M., B. Breyholtz og J. Skei. 2006. Experimental results on effects of capping on fluxes of persistent organic pollutants (POPS) from historically contaminated sediments. *Marine Chemistry* 102: 46-59.
- Scott, A. P., I. Katsiadaki, P. R. Witthames, K. Hylland, I. M. Davies, A. D. McIntosh og J. Thain. 2006. Vitellogenin in the blood plasma of male cod (*Gadus morhua*): A sign of oestrogenic endocrine disruption in the open sea? *Marine Environmental Research* 61: 149-170.
- SFT. 1997. (Statens forurensningstilsyn) Klassifisering av miljøkvalitet i fjorder og kystvann. Veiledning 97:03. TA-nummer 1467/1997.
- Siegel, S. og N. J. Castellan. 1988. *Nonparametric statistics for behavioral sciences* (2. utgave). New York: McGraw-Hill: 213-215.
- Soclo, H. H., P. Garrigues og M. Ewald. 2000. Origin of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in Coastal Marine Sediments: Case Studies in Cotonou (Benin) and Aquitaine (France) Areas. *Marine Pollution Bulletin* 40: 387-396.
- Stegeman, J. J. 1992. Nomenclature for hydrocarbon-inducible cytochrome P450 in fish. *Marine Environmental Research* 34: 133-138.
- Stein, J. E., T. K. Collier, W. L. Reichert, E. Casillas, T. Hom og U. Varanasi. 1992. BIOINDICATORS OF CONTAMINANT EXPOSURE AND SUBLETHAL EFFECTS: STUDIES WITH BENTHIC FISH IN PUGET SOUND, WASHINGTON. *Environmental Toxicology and Chemistry* 11: 701-714.
- Student. 1908. The Probable Error of a Mean. *Biometrika* 6: 1-25.
- Thomann, R. V. og J. P. Connolly. 1984. Model of PCB in the Lake Michigan lake trout food chain. *Environmental Science & Technology* 18: 65-71.
- Tyler, C. R., R. van Aerle, T. H. Hutchinson, S. Maddix og H. Trip. 1999. AN IN VIVO TESTING SYSTEM FOR ENDOCRINE DISRUPTORS IN FISH EARLY LIFE STAGES USING INDUCTION OF VITELLOGENIN. *Environmental Toxicology and Chemistry* 18: 337-347.
- Van der Oost, R., J. Beyer og N. P. E. Vermeulen. 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 13: 57-149.
- Van Hoof, P. L., J. V. K. Kukkonen og P. F. Landrum. 2001. IMPACT OF SEDIMENT MANIPULATION ON THE BIOACCUMULATION OF POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBONS FROM FIELD-CONTAMINATED AND LABORATORY-DOSED SEDIMENTS BY AN OLIGOCHAETE. *Environmental Toxicology and Chemistry* 20: 1752-1761.
- Van Veld, P. A., B. J. Rutan, C. A. Sullivan, L. D. Johnston, C. D. Rice, D. F. Fisher og L. T. Yonkos. 2005. A UNIVERSAL ASSAY FOR VITELLOGENIN IN FISH MUCUS AND PLASMA. *Environmental Toxicology and Chemistry* 24: 3048-3052.

- Varanasi, U., W. L. Reichert, J. E. Stein, D. W. Brown og H. R. Sanborn. 1985. Bioavailability and biotransformation of aromatic hydrocarbons in benthic organisms exposed to sediment from an urban estuary. *Environ. Sci. Technol.* 19: 836-841.
- Varanasi, U., M. Uhler og S. I. Stranahan. 1978. Uptake and release of naphthalene and its metabolites in skin and epidermal mucus of salmonids. *Toxicology and Applied Pharmacology* 44: 277-289.
- Vo-Dihn, T. 1978. Multicomponent analysis by synchronous luminescence spectrometry. *Analytical Chemistry* 50: 396-401.
- Wheeler, J. R., S. Gimeno, M. Crane, E. Lopez-Juez og D. Morritt. 2005. Vitellogenin: A Review of Analytical Methods to Detect (Anti) Estrogenic Activity in Fish. *Toxicology Mechanisms and Methods* 15:4: 293-306.
- White, P. A., S. Robitaille og J. B. Rasmussen. 1999. HERITABLE REPRODUCTIVE EFFECTS OF BENZO[a]PYRENE ON THE FATHEAD MINNOW (PIMEPHALES PROMELAS). *Environmental Toxicology and Chemistry* 18: 1843-1847.
- Whyte, J. J., R. E. Jung, C. J. Schmitt og D. E. Tillitt. 2000. Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity in fish as a biomarker of chemical exposure. *Critical Reviews in Toxicology* 30: 347-570.
- Willett, K. L., D. Wassenberg, L. Lienesch, W. Reichert og R. T. Di Giulio. 2001. In Vivo and in Vitro Inhibition of CYP1A-Dependent Activity in *Fundulus heteroclitus* by the Polynuclear Aromatic Hydrocarbon Fluoranthene. *Toxicology and Applied Pharmacology* 177: 264-271.
- Økland, T. E. 2005. KOSTHOLDSRÅD i norske havner og fjorder. En gjennomgang av kostholdsråd i norske havner og fjorder fra 1960-tallet til i dag. *Mattilsynet*. 272 sider.

Personlig kommunikasjon

Hylland, Professor Ketil, Universitetet i Oslo, Biologisk institutt, Postboks 1066 Blindern, 0316 Oslo

Vedlegg

Adresser

Seabait Limited.

Kenneth D Cowin House Woodhorn
Village
Ashington
Northumberland
NE63 9NW, Storbritannia

PerkinElmer Life And Analytical
Sciences
Inc., 940 Winter Street
Waltham
Massachusetts 02451 USA

Marin Invest AS
1546 Sandøy

NUNC A/S
Kamstrupvej 90, Postbox 280
DK-4000
Roskilde
Danmark

Marine Harvest Norway AS
6092 Eggesbønes

Bio-Rad Laboratories
Johan Scharffenbergs vei 91
N-0694 Oslo

Skretting advanced fish feed,
Coapse fish – 23
Westport office
Skretting Roman Island
Co Mayo
Ireland.

Robert Bosch AS
Elektroverktøy
Berghagan 1
Postboks 350
1402 Ski

Sigma-Aldrich Norway AS
Tevlingveien 23
Postboks 188 Leirdal
1081 Oslo

Haereus
Hanau
Tyskland

Biosense Laboratories AS
Thormøhlensgt. 55
Bergen, N-5008

Skatron Instruments AS
Dølasletta 3
3408 Tranby

BRAND GMBH + CO KG
Otto-Schott Str. 25
97877 Wertheim
Tyskland

Molecular Devices
1311 Orleans Drive
Sunnyvale, CA 94089-1136
U.S.A.

Beckham Instruments
Fullerton
CA
USA

Analyser av sediment

	KORN<63µm % t.v	TOC (totale karbonmengde)
1518-1 E-sediment (foring)	78.2	30.3
1518-2 E-sediment (foring)	70	30.9
1518-3 E-sediment (foring)	80.7	29.7
1518-4 K-sediment (foring)	78.2	6.5
1518-5 K-sediment (foring)	72.1	10.3
1518-6 K-sediment (foring)	74.2	5.1
Sediment dag 0 (1) G.597-1 (oppvirvling)	89	32.1
Sediment dag 0 (2) G.597-2 (oppvirvling)	85	28.3
Sediment dag 0 (3) G.597-3 (oppvirvling)	88	41.4

Eksperiment	Matrix	Gruppe	Da g	Prøve	PCB-28 (µg/kg t.v.)	PCB-52 (µg/kg t.v.)	PCB-101 (µg/kg t.v.)	PCB-118 (µg/kg t.v.)
Opphvirvling	Sediment	Eksposter	0	1	0.91	1.2	1.6	1.3
Opphvirvling	Sediment	Eksposter	0	2	0.8	1.1	1.5	1.2
Opphvirvling	Sediment	Eksposter	0	3	0.71	0.92	1.1	1
Foring	Sediment	Eksposter	0	1	2.7	3.8	4.4	4.9
Foring	Sediment	Eksposter	0	2	2.8	4.3	4.8	5.5

Foring	Sediment	Eksposter	0	3	2.9	4.3	4.9	5.5
Foring	Sediment	Kontroll	0	1	<0,5		<0,5	<0,5
Foring	Sediment	Kontroll	0	2	<0,5		<0,5	<0,5
Foring	Sediment	Kontroll	0	3	<0,5		<0,5	<0,5
<div> <div>PCB-153</div> <div>PCB-138</div> <div>PCB-180</div> <div>Sum-PCB7</div> <div>(µg/kg t.v.)</div> <div>(µg/kg t.v.)</div> <div>(µg/kg t.v.)</div> <div>(µg/kg t.v.)</div> </div>								
Opphvirvling	Sediment	Eksposter	0	1	2.1	2.6	0.98	10.69
Opphvirvling	Sediment	Eksposter	0	2	2	2.5	0.92	10.02
Opphvirvling	Sediment	Eksposter	0	3	1.5	1.9	0.71	7.84
Foring	Sediment	Eksposter	0	1	11	7.7	3.9	38.4
Foring	Sediment	Eksposter	0	2	12	8.4	4.4	42.2
Foring	Sediment	Eksposter	0	3	11	8.2	4.5	41.3
Foring	Sediment	Kontroll	0	1	<0,5	<0,5	<0,5	0
Foring	Sediment	Kontroll	0	2	<0,5	<0,5	<0,5	0
Foring	Sediment	Kontroll	0	3	<0,5	<0,5	<0,5	0

Eksperiment	Matrix	Gruppe	Dag	Prøve	Naftalen (µg/kg t.v.)	Acenaftylen (µg/kg t.v.)	Acenaften (µg/kg t.v.)	Fluoren (µg/kg t.v.)
Opphvirvling	Sediment	Eksposter	0	1	150	45	44	170
Opphvirvling	Sediment	Eksposter	0	2	100	13	37	61
Opphvirvling	Sediment	Eksposter	0	3	140	15	34	58

Foring	Sediment	Ekspone r t	0	1	120	14	35.5	59.5
Foring	Sediment	Ekspone r t	0	2	180	32	24	43
Foring	Sediment	Ekspone r t	0	3	270	28	570	730
Foring	Sediment	Kontroll	0	1	3.5	<2	<2	<2
Foring	Sediment	Kontroll	0	2	3.8	<2	<2	<2
Foring	Sediment	Kontroll	0	3	12	<2	<2	3.9
					Dibenzotiofe n (µg/kg t.v.)	Fenantren (µg/kg t.v.)	Antracen (µg/kg t.v.)	Fluorant en (µg/kg t.v.)
Opphvirvling	Sediment	Ekspone r t	0	1	100	1200	310	1900
Opphvirvling	Sediment	Ekspone r t	0	2	33	340	91	420
Opphvirvling	Sediment	Ekspone r t	0	3	29	290	88	410
Foring	Sediment	Ekspone r t	0	1	67	750	210	1300
Foring	Sediment	Ekspone r t	0	2	41	320	110	680
Foring	Sediment	Ekspone r t	0	3	430	6200	1600	7000
Foring	Sediment	Kontroll	0	1	<2	14	2	45
Foring	Sediment	Kontroll	0	2	<2	6.6	<2	19
Foring	Sediment	Kontroll	0	3	<2	17	3.6	33
					Pyren (µg/kg t.v.)	Benzo(a)antrac en (µg/kg t.v.)	Krysen (µg/kg t.v.)	Benzo(b,j) fluoranten (µg/kg t.v.)
Opphvirvling	Sediment	Ekspone r t	0	1	2000	960	520	780
Opphvirvling	Sediment	Ekspone r t	0	2	560	180	130	220
Opphvirvling	Sediment	Ekspone r t	0	3	550	210	140	220
Foring	Sediment	Ekspone r t	0	1	1300	670	520	1300

Foring	Sediment	Ekspone- r t	0	2	900	420	300	1100
Foring	Sediment	Ekspone- r t	0	3	5200	3700	2500	5000
Foring	Sediment	Kontroll	0	1	38	23	28	53
Foring	Sediment	Kontroll	0	2	17	6.2	7.3	13
Foring	Sediment	Kontroll	0	3	44	7.8	7.7	16
					Benzo(k)flu- ranten (µg/kg t.v.)	Benzo(e)pyren (µg/kg t.v.)	Benzo(a)py- ren (µg/kg t.v.)	Perylen (µg/kg t.v.)
Opphvirvling	Sediment	Ekspone- r t	0	1			970	260
Opphvirvling	Sediment	Ekspone- r t	0	2			220	75
Opphvirvling	Sediment	Ekspone- r t	0	3			230	75
Foring	Sediment	Ekspone- r t	0	1	460	710	800	240
Foring	Sediment	Ekspone- r t	0	2	390	610	610	180
Foring	Sediment	Ekspone- r t	0	3	1800	2300	3300	790
Foring	Sediment	Kontroll	0	1	17	25	34	18
Foring	Sediment	Kontroll	0	2	3.5	7.8	6	20
Foring	Sediment	Kontroll	0	3	4.4	9	5.8	20
					Indeno(1,2,3- cd)antracen (µg/kg t.v.)	Dibenz(a,h)antr- acen (µg/kg t.v.)	Benzo(ghi)p- erylen (µg/kg t.v.)	Sum PAH (µg/kg t.v.)
Opphvirvling	Sediment	Ekspone- r t	0	1	680	170	590	12919
Opphvirvling	Sediment	Ekspone- r t	0	2	200	45	190	3405
Opphvirvling	Sediment	Ekspone- r t	0	3	220	51	210	3470
Foring	Sediment	Ekspone- r t	0	1	970	140	940	10657
Foring	Sediment	Ekspone- r t	0	2	830	120	840	7730

Foring	Sediment	Ekspone r	0	3	3100	660	2500	47678
Foring	Sediment	Kontroll	0	1	29	4.8	34	368.3
Foring	Sediment	Kontroll	0	2	9.2	<2	11	130.4
Foring	Sediment	Kontroll	0	3	10	<2	15	209.2

Analyser av børstemark

Market	TTS/%	Naftale n µg/kg v.v.	Acenaftylen µg/kg v.v.	Acenaften µg/kg v.v.	Flouren µg/kg v.v.	Dibenzotiofe n µg/kg v.v.	Fenantren µg/kg v.v.
E-mark G.kode 1519-2	18	2.3	0.69	0	0	0	1.9
K-mark G.kode 1519-5	20	2.8	0	0	0	0	0.75
E-mark Batch 1 G.kode 1519-3	20	5.2	0.93	0.63	0.57	0	1.9
K-mark Batch 1 G.kode 1519-6	21	5.3	0	0	0	0	0.67
E-mark N.vir. G.kode 1519-1	17	5.3	0.64	0.52	0	0	1.5
K-mark N.vir. G.kode 1519-4	17	5.1	0	0	0	0	0.94

Market	Pyren µg/kg v.v.	Benzo[a]antrace n µg/kg v.v.	Kyrsen µg/kg v.v.	Benzo[e]fluoranten µg/kg v.v.	Benzo[a]pyr en µg/kg v.v.	Perylen (µg/kg v.v.)
E-mark G.kode 1519-2	36	1.7	2.6	8.1	3.7	1.2
K-mark G.kode 1519-5	1.6	0	0	0	0	0.55

E-mark Batch 1 G.kode 1519-3	32	1.2	2.1	7.3	2.6	0.99
K-mark Batch 1 G.kode 1519-6	1.4	0	0	0	0	0
E-mark N.vir. G.kode 1519-1	31	0.82	1.6	6.9	1.7	0.69
K-mark N.vir. G.kode 1519-4	1.3	0	0	0	0	0

Merket	Perylen (µg/kg v.v.)	Indeno(1,2,3 -cd)antracen (µg/kg v.v.)	Dibenz(a,h)antracene (µg/kg v.v.)	Benzo(ghi)perylene (µg/kg v.v.)	Sum PAH µg/kg v.v.
E-mark G.kode 1519-2	1.2	3.7	1.2	6.9	82.59
K-mark G.kode 1519-5	0.55	0	0	0	7.84
E-mark Batch 1 G.kode 1519-3	0.99	2.6	0.87	5.8	74.89
K-mark Batch 1 G.kode 1519-6	0	0	0	0	8.67
E-mark N.vir. G.kode 1519-1	0.69	2.5	0.79	5.5	67.42
K-mark N.vir. G.kode 1519-4	0	0	0	0	8.64

Eksperiment	Matrix	Gruppe	Prøve	Fett (% v.v.)	PCB-28 (µg/kg v.v.)	PCB-52 (µg/kg v.v.)
Foring	Mark	Eksposter	1	2.2	0.54	1.3
Foring	Mark	Eksposter	2	2.8	0.71	2.3
Foring	Mark	Eksposter	3	4.3	0.66	1.6
Foring	Mark	Kontroll	1	2.3	0.08	0.24

Foring	Mark	Kontroll	2	2.8	0.12	0.55
Foring	Mark	Kontroll	3	4.4	0.13	0.42
				PCB-101 (µg/kg v.v.)	PCB-118 (µg/kg v.v.)	PCB-153 (µg/kg v.v.)
Foring	Mark	Ekspone r	1	2.6	2.1	3.9
Foring	Mark	Ekspone r	2	3.6	2.5	5.5
Foring	Mark	Ekspone r	3	2.8	2.3	4.4
Foring	Mark	Kontroll	1	0.94	0.77	1.4
Foring	Mark	Kontroll	2	0.81	0.84	1.6
Foring	Mark	Kontroll	3	0.75	0.82	1.6
				PCB-138 (µg/kg v.v.)	PCB-180 (µg/kg v.v.)	Sum-PCB7 (µg/kg v.v.)
Foring	Mark	Ekspone r	1	3.6	1.4	15.44
Foring	Mark	Ekspone r	2	5.1	1.9	21.61
Foring	Mark	Ekspone r	3	4	1.6	17.36
Foring	Mark	Kontroll	1	1.2	0.45	5.08
Foring	Mark	Kontroll	2	1.3	0.46	5.68
Foring	Mark	Kontroll	3	1.3	0.47	5.49

Data for fisk i fôringsforsøket

Fisk	Dag	Vekt (g)	Vekt (g)	Vekt	Kondisjon (vekt i g.)
	Lengde	ved dag	ved	lever	

	(cm)	0		prøvetakning	(g)	*100)/(lengde i cm^3)
1	0	19.5		50.04	0.94	0.674859657
2	0	22		72.85	2.09	0.684166041
3	0	20		55.99	1.25	0.699875
4	0	25		63.75	1.94	0.408
5	0	21		65.75	2.03	0.709966526
6	0	19		46.45	1.74	0.677212422
7	0	20		57.8	2.3	0.7225
8	0	18		53.53		0.917866941
K-1	13	23	97	97.48	4.95	0.801183529
K-2	13	21.5	70	66.56	2.75	0.669727194
K-3	13	23.5	92	90.07	4.24	0.694027335
E-1	13	23	78	74.27	1.48	0.610421632
E-2	13	22	89	91.9	6.75	0.863072878
E-3	13	25	104	104.8	3.43	0.67072
K-4	26	19.5	60	59.3	1.1	0.799743758
K-5	26	20	62	69.2	1.3	0.865
K-6	26	22	68	74.6	1.8	0.700601052
E-4	26	22.5	86	90	3.9	0.790123457
E-5	26	23	81	95.3	3	0.783266212
E-6	26	22	81	81.5	3.2	0.765401953
K-7	39	21.5	60	83.63	3.18	0.841485655
K-8	39	20	74	56.68	1.28	0.7085
K-9	39	21.5	77	95.27	3.47	0.958607418
E-7	39	21	72	80.35	1.89	0.867616888
E-8	39	22	89	96.77	2.19	0.908809166
E-9	39	22.5	93	94.98	3.58	0.833843621
K-10	52	23.5	83	92.72	4.43	0.714446703
K-11	52	22.5	69	96.62	5.51	0.848241427

K-ekstra-2	52	21	73	79.3	4.23	0.85627902
E-10	52	21.5	62	66.72	1.78	0.671337115
E-11	52	22	79	84.15	2.31	0.790289256
E-12	52	21.5	63	77.82	1.63	0.783025394
K-13	66	23.2	103	107	3.18	0.856879638
K-14	66	23.2	92	114.7	4.45	0.918542939
K-15	66	19.6	60	65.8	1.75	0.873891831
E-13	66	24	100	108.88	2.92	0.787615741
E-14	66	21	63	76.8	2.58	0.829284095
E-15	66	23.8	96	109	2.95	0.808529047
K-16	97	22	66	82.6	2.3	0.775732532
K-17	97	23	69	99.6	2.3	0.818607709
K-18	97	22	76	88.4		0.830202855
E-16	97	21	66	83	1.8	0.896231508
E-17	97	25.5	103	118.8	2.9	0.716466517
E-18	97	23.5	101	114.2	3.9	0.879959161
K-19	129	23.5	71	104.3	3.6	0.803675486
K-20	129	24.8	91	128.8	3.3	0.844424491
K-21	129	22	71	95.9	2.1	0.900638618
K-ekstra-1	129	22.4	64	91.4	2	0.813208933
K-12	129	22.5	73	88.4	2.4	0.776076818
K-ekstra-3	129	23.5	70	103.1	3.2	0.79442898
K-ekstra-4	129	24.5	89	111.7	4.7	0.759547467
K-ekstra-5	129	23	65	99.3	3.1	0.816142024
K-ekstra-6	129	24	80	109.2	3.3	0.789930556
E-19	129	22.3	60	94.5	3.3	0.852152298
E-20	129	24	72	107.2	3.7	0.775462963
E-ekstra-1	129	23.1	61	90.8	1.8	0.73663086
E-ekstra-2	129	25.5	84	114.5	2.5	0.690533807

E-ekstra-3	129	23.4	71	98.4	2.4	0.767975784
E-ekstra-4	129	23.5	78	100.6	2.2	0.775165426
E-ekstra-5	129	23.6	75	107.9	3.9	0.82089089
E-ekstra-6	129	23.5	70	96.5	2.3	0.743573197

PCB i lever

Da g	Gruppe	Fisk nr	TTS (%)	Fett (% v.v.)	PCB- 28 (µg/kg v.v.)	PCB- 52 (µg/k g v.v.)	PCB- 101 (µg/k g v.v.)	PCB- 118 (µg/k g v.v.)	PCB- 153 (µg/k g v.v.)	PCB- 138 (µg/k g v.v.)	PCB- 180 (µg/k g v.v.)	Sum PCB ₇ (µg/k g v.v.)
0	Ekspone r	1	75	36	5,2	23	74	61	150	110	39	462,2
0	Ekspone r	2	78,6	55	5,2	15	46	38	75	60	21	260,2
0	Ekspone r	3	40	37	3,2	14	44	37	88	66	25	277,2
13	Ekspone r	1	41,7	59	14	36	120	98	220	180	66	734
13	Ekspone r	2	73,4	57	3	10	19	20	34	29	12	127
13	Ekspone r	3	61	54	5,8	14	43	30	58	47	16	213,8
26	Ekspone r	1	60	51	6,9	18	40	32	61	53	18	228,9
26	Ekspone r	2	66	44	9,2	25	53	44	89	71	26	317,2
26	Ekspone r	3	63,4	51	8,3	21	57	45	83	73	26	313,3
39	Ekspone r	1	48,8	43	12	35	87	66	140	120	44	504
39	Ekspone r	2	47	34	8,8	29	71	54	120	110	34	426,8
39	Ekspone r	3	65	54	7,7	20	51	38	77	64	22	279,7
52	Ekspone r	1	46	33	8,9	31	75	58	130	110	37	449,9
52	Ekspone r	2	54	41	8,9	27	61	46	100	90	32	364,9
52	Ekspone r	3	48	38	9,2	35	82	60	130	120	42	478,2
66	Ekspone r	1	57	46	8,6	28	68	53	110	97	35	399,6
66	Ekspone r	2	60	48	10	37	81	60	120	110	36	454
66	Ekspone r	3	63	50	9,6	34	79	59	120	110	37	448,6
97	Ekspone r	1	56	43	12	47	110	83	180	160	57	649
97	Ekspone r	2	54	38	12	40	93	73	150	130	46	544
97	Ekspone r	3	61	54	16	41	77	65	150	120	46	515

	t											
	Eksponer											
129	t	1	67	51	18	49	82	69	150	140	50	558
	Eksponer											
129	t	2	61	52	19	59	98	79	170	160	59	644
	Eksponer											
129	t	3	52	36	18	67	120	100	230	210	81	826
0	Kontroll	1	53	37	2,6	12	30	30	70	50	21	215,6
0	Kontroll	2	64	42	3,9	14	28	27	56	45	17	190,9
0	Kontroll	3	61	46	4	16	32	30	67	51	19	219
13	Kontroll	1	66	52	3,6	13	25	23	47	37	15	163,6
13	Kontroll	2	59	47	3,6	14	25	25	44	37	15	163,6
13	Kontroll	3	68	58	3,1	8,3	22	22	33	28	10	126,4
26	Kontroll	1	47	27	2,7	10	32	29	69	53	19	214,7
26	Kontroll	2	39	30	3,9	12	35	34	80	61	22	247,9
26	Kontroll	3	51	37	3,7	12	33	32	72	53	19	224,7
39	Kontroll	1	57	46	3,8	12	27	25	56	43	15	181,8
39	Kontroll	2	36	25	2,7	10	28	30	72	53	19	214,7
39	Kontroll	3	62	52	3,8	13	32	29	61	46	16	200,8
52	Kontroll	1	67	65	4	13	26	26	50	39	16	174
52	Kontroll	2	60	48	2,8	10	23	22	50	35	14	156,8
52	Kontroll	3	67	50	2,6	9,5	23	21	41	32	14	143,1
66	Kontroll	1	40	30	4,8	13	35	31	71	55	19	228,8
66	Kontroll	2	78	59	3,9	16	33	28	56	43	17	196,9
66	Kontroll	3	54	40	3,2	14	44	37	92	70	23	283,2
97	Kontroll	1	56	40	4,8	18	41	35	76	59	20	253,8
97	Kontroll	2	56	43	5,8	20	39	34	81	59	20	258,8
97	Kontroll	3	59	46	4,5	18	43	36	85	63	22	271,5
129	Kontroll	1	74	59	4,6	20	34	30	68	51	18	225,6
129	Kontroll	2	56	44	6,5	21	45	38	87	65	22	284,5
129	Kontroll	3	51	41	5,1	18	42	37	87	65	22	276,1

PAH-metabolitter i galle

(**Uthevede tall** er fra prøver som ble analysert to ganger for å undersøke at senere analyser var sammenliknbare. Tallene fra første måling ble brukt i analyser)

Måling av PAH-metabolitter.

Foringsforsøk

28-apr

Fisk	Da g	Volum	Absorbans e 380	λ 256- 380	λ 290- 335	λ 341- 383	λ 380- 430
ST1 Pyren		1:10 løsning		52,3	2,7	42,2	26,6
ST2 Naftalen		1:10 løsning		18,6	9,5	5,2	0,3
ST3 Fenantren		1:10 løsning		157,5	3,9	10,6	0,4
K-3	13	10 µl	0,253	5,6	4,7	(-)0,8	0,4
E-15	66	10 µl	0,106	6	1,7	0,6	0,2

E-13	66	10 µl	0,14	8,9	4,2	1	0,4
E-9	39	10 µl	0,141	5,4	2,8	0,7	0
K-1	13	10 µl	0,27	6,9	5,2	1,1	0,4
E-1	13	10 µl	0,275	6,9	3,4	0,9	0,6
K-ekstra-2	52	10 µl	0,19	4,6	3,3	0,9	0,6
E-2	13	10 µl	0,282	7,3	4,6	1,1	0,5
E-12	52	10 µl	0,294	7,8	5,3	1,1	0,3
E-10	52	10 µl	0,124	10,2	10	1,2	0,4
04-mai							
ST1 Pyren		1:10 løsnig		18,6	0,7	39,3	27
ST2 Naftalen		1:10 løsnig		8,3	5,5	4,9	0,1
ST3 Fenantren		1:10 løsnig		80,5	1,3	10,5	0,4
E-3	13	10 µl	0,485	2,7	2,2	1	0,3
K-8	39						
E-14	66	10 µl	0,107	4,1	2,2	1,4	0,4
K-13	66	10 µl	0,207	1,1	1,2	0,5	0,3
K-14	66	10 µl	0,263	0,6	0,5	0,4	0,3
	2	0 10 µl	0,226	2,2	2,3	1	0,9
E-7	39	10 µl	0,074	1,2	0,7	0,4	0,1
	6	0					
E-11	52	10 µl	0,172	3,2	2,3	0,9	0,3
K-2	13	10 µl	0,557	0,8	2,3	0,3	0,2
ST1 Pyren		1:10 løsnig		17,3	0,6	34,6	25,2
ST2 Naftalen		1:10 løsnig		7,7	5,1	4,9	0,1
ST3 Fenantren		1:10 løsnig		81,7	1	10,6	0,4
05-mai							
ST1 Pyren		1:10 løsnig		19,5	1,1	41,4	25,5
ST2 Naftalen		1:10 løsnig		8,5	6,7	4,9	0,1
ST3 Fenantren		1:10 løsnig		94	1,7	11	0,4
K-15	66	10 µl	0,081	0,7	0,5	0,3	0,1
K-5	26						
K-9	39						
	7	0 10 µl	0,137	0,8	1,6	0,3	0,2
K-6	26	10 µl	0,053	0,6	0,5	0,3	0,1
E-4	26						
K-10	52	10 µl	0,124	1,1	1,4	0,5	0,2
K-4	26						
E-8	39						
K-11	52	10 µl	0,133	1,2	1,2	0,5	0,2
	8	0 10 µl	0,249	1,5	1,8	0,6	0,4
E-5	26	10 µl	0,174	2,4	2,1	0,7	0,2
	1	0					
	4	0 10 µl	0,214	1,3	3,5	0,4	0,3
	3	0					
K-7	39						
	5	0					
E-6	26						
ST1 Pyren		1:10 løsnig		19,5	1,2	38,3	25,9
ST2 Naftalen		1:10 løsnig		8,8	6,5	5,1	0,2
ST3 Fenantren		1:10 løsnig		107,3	1,7	11,7	0,4
30-aug							
ST1 Pyren		1:10 løsnig		3,8	10,6	15,1	10,6
ST2 Naftalen		1:10 løsnig		0	12,3	5,6	0
ST3 Fenantren		1:10 løsnig		1,8	10,8	7	0,2
E-15	66	10 µl	0,094	3	1,1	0,4	0,1
K-14	66	10 µl	0,262	2,5	1,6	0,6	0,2
E-3	13	10 µl	0,445	6,6	3,6	1,1	0,4
E-2	13	10 µl	0,229	6,6	4,6	0,9	0,3

K-11	52	10 µl	0,178	3,1	2,4	0,7	0,3
E-1	13	10 µl	0,264	6	3	0,8	0,3
K-20	129	10 µl	0,037	0,9	0,6	0,2	0,1
K-ekstra-3	129	10 µl	0,035	0,9	0,6	0,2	0,1
E-ekstra-5	129	10 µl	0,087	7,7	3,1	1,1	0,3
E-18	97	10 µl	0,057	4,1	1,6	0,5	0,2
ST1 Pyren		1:10 løsning		0,1	21,6	19	12,7
ST2 Naftalen		1:10 løsning		0,3	23,6	6,2	0,1
ST3 Fenantren		1:10 løsning		2,5	20,1	7,6	0,4
K-18	97						
K-17	97	10 µl	0,156	2,7	1,9	0,4	0,1
E-ekstra-1	129	10 µl	0,074	7,6	3,1	1,3	0,4
K-ekstra-6	129	10 µl	0,079	1,7	1,4	0,4	0,2
E-ekstra-2	129	10 µl	0,045	7,7	3,4	1,1	0,2
E-ekstra-3	129	10 µl	0,034	3,9	1,7	0,7	0,3
K-21	129	10 µl	0,08	2	1,4	0,5	0,2
K-19	129	10 µl	0,087	2,4	1,4	0,4	0,1
E-17	97	10 µl	0,151	8,7	3,5	1,4	0,3
K-ekstra-1	129	10 µl	0,1	1,7	1,2	0,3	0,2
K-ekstra-5	129	10 µl	0,074	1,8	1	0,3	0,1
ST1 Pyren		1:10 løsning		0,4	23,9	18,9	12,5
ST2 Naftalen		1:10 løsning		0,6	26,3	6,3	0,2
ST3 Fenantren		1:10 løsning		3,6	23,4	7,8	0,4
E-16	97	10 µl	0,09	7	2,9	0,8	0,2
E-ekstra-4	129	10 µl	0,077	17,5	4,4	2,7	0,7
K-12	129	10 µl	0,034	0,9	0,7	0,2	0,1
E-20	129	10 µl	0,088	10,6	4,1	1,2	0,4
K-16	97	10 µl					
E-19	129	10 µl	0,076	8	3,4	1	0,3
K-ekstra-4	129	10 µl	0,053	2	2,5	0,4	0,2
E-ekstra-6	129	10 µl	0,098	8,5	3,3	1	0,3

Biomarkører

Fisk	Gruppe	Dag	Cyp	VTG 1:50	ZRP	EROD
						(pmol/min/mg protein)
E1	Ekspontert	13	0,753	25860	0,230	5,58
E2	Ekspontert	13	0,399	29444	0,201	8,23
E3	Ekspontert	13	0,258	11030	0,202	8,27
E4	Ekspontert	26	0,328	33642	0,401	24,02
E5	Ekspontert	26	0,476	26326	0,270	33,58
E6	Ekspontert	26	0,184	21242	0,348	7,92
E7	Ekspontert	39	0,393	9949	0,278	21,28
E8	Ekspontert	39	0,25		0,285	19,46
E9	Ekspontert	39	0,24	30597	0,410	34,31

E10	Ekspionert	52	0,521		0,297	24,26
E11	Ekspionert	52	0,501	16521	0,326	13,71
E12	Ekspionert	52	0,323		0,276	5,44
E13	Ekspionert	66	0,707		0,294	35,88
E14	Ekspionert	66	1,24		0,357	51,87
E15	Ekspionert	66	0,744	22995	0,336	18,30
E16	Ekspionert	97	0,516	28159	0,345	64,13
E17	Ekspionert	97	0,266	8345	0,321	25,24
E18	Ekspionert	97	0,239	28514	0,303	39,22
E19	Ekspionert	129	0,339	9909	0,341	24,63
E20	Ekspionert	129	0,45	8434	0,326	37,75
Ee1	Ekspionert	129	0,827	6090	0,280	37,11
Ee2	Ekspionert	129	1,098	844	0,345	7,08
Ee3	Ekspionert	129	0,476	27520	0,384	38,97
Ee4	Ekspionert	129	3,246	33213		57,18
Ee5	Ekspionert	129	0,256	35895	0,349	59,82
Ee6	Ekspionert	129	0,449	39321	0,361	3,44
1-0	Kontroll	0	0,494	14394	0,364	3,81
2-0	Kontroll	0	0,033	30137		33,33
3-0	Kontroll	0	0,385	37425	0,323	4,17
4-0	Kontroll	0	0,474	25287	0,281	2,51
5-0	Kontroll	0	0,38	30645	0,371	14,30
6-0	Kontroll	0	0,358	9819	0,305	11,09
7-0	Kontroll	0	0,474	37745	0,275	11,43
8-0	Kontroll	0	0,776	11991	0,205	12,50
K1	Kontroll	13	0,289	2978	0,283	16,41
K2	Kontroll	13	0,317	37445	0,274	6,50
K3	Kontroll	13	0,183	15930	0,280	3,84
K4	Kontroll	26	0,477	33443	0,313	0,36
K5	Kontroll	26	0,2	33054	0,348	9,14
K6	Kontroll	26	0,353		0,252	3,76
K7	Kontroll	39	0,126	13496	0,355	17,94
K8	Kontroll	39	0,412	23505	0,274	2,64
K9	Kontroll	39	0,195		0,314	17,63
K10	Kontroll	52	0,27	8271	0,249	15,87
K11	Kontroll	52	0,244	28562	0,314	15,49
Ke2	Kontroll	52	0,208	64328	0,325	44,17
K13	Kontroll	66	0,191		0,304	41,40
K14	Kontroll	66	0,229	33927	0,328	19,91
K15	Kontroll	66	0,276	15336	0,242	34,65

K16	Kontroll	97	0,39		0,208	25,98
K17	Kontroll	97	0,18	30749	0,286	5,80
K18	Kontroll	97	0,185		0,316	29,68
K12	Kontroll	129	0,174			10,72
K19	Kontroll	129	0,296	27636	0,261	48,97
K20	Kontroll	129	0,378	31189	0,255	29,04
K21	Kontroll	129	0,247	31635	0,280	13,92
Ke1	Kontroll	129	0,273	23204	0,241	21,31
Ke3	Kontroll	129	0,286	4999	0,339	23,17
Ke4	Kontroll	129	0,189		0,242	45,98
Ke5	Kontroll	129	0,24	22704	0,291	16,34
Ke6	Kontroll	129	0,276	32614	0,304	11,16

Data for fisk i oppvirvlingsforsøket

Gruppe	Kar	Replika	Lengde	Vekt	Levervekt	Kjønn	Kondisjon (vekt i g. *100)/(lengde i cm ³)
	r	t	dag	(cm)	(g)		
Kontroll	1		0	37	513,5	F	1,013760291
Kontroll	2		0	37,5	509,4	M	0,965973333
Kontroll	3		0	31	258,5	M	0,867711725
Ekspionert	1		0	36	340,9	F	0,73066701
Ekspionert	2		0	30	258,75	F	0,958333333
Ekspionert	3		0	36	391,4	M	0,838906036
Kontroll	1		13	39	557,5	F	0,93983378
Kontroll	2		13	36,5	571,4	M	1,175064329
Kontroll	3		13	36,5	492,7	M	1,013220502
Ekspionert	1		13	32,5	285,3	F	0,83109695
Ekspionert	2		13	27	497,5	M	2,527561855
Ekspionert	3		13	36	406,5	M	0,871270576
Kontroll	1		26	36	641,7	F	1,375385802
Kontroll	2		26	37	469	F	0,925907646
Kontroll	3		26	40	862,5	F	1,34765625
Ekspionert	1		26	34	439,2	F	1,117443517
Ekspionert	2		26	35	472,2	F	1,101341108
Ekspionert	3		26	38	502,3	M	0,91540312
Kontroll	1		39	35,5	446	M	0,996895876
Kontroll	2		39	38,8	752,8	F	1,288796754
Kontroll	3		39	34,5	385	M	0,937569443
Ekspionert	1		39	35,3	409,7	M	0,93141204
Ekspionert	2		39	36,5	531,5	F	1,093011359
Ekspionert	3		39	35	393,2	M	0,917084548
Kontroll	1		52	40,7	612	F	0,907754048
Kontroll	2		52	33,2	361	F	0,986490599
Kontroll	3		52	37,8	520	M	0,96278196

Ekspionert	1		52	37,5	500	40,4	M	0,948148148
Ekspionert	2		52	35,5	466	48,1	M	1,041599727
Ekspionert	3		52	35	373	27,6	M	0,869970845
Kontroll	1	1	66	40,8	643	48,18	F	0,94673947
Kontroll	1	2	66	36,9	441	25,75	F	0,877727067
Kontroll	1	3	66	37,5	394	59,6	F	0,747140741
Kontroll	2	1	66	37,7	533	43,93	F	0,994725287
Kontroll	2	2	66	35,3	425	35,23	F	0,966195063
Kontroll	2	3	66	53,8	338	21,93	M	0,217055039
Kontroll	3	1	66	38	537	48,34	M	0,978641201
Kontroll	3	2	66	36,2	369	20,31	F	0,777858594
Ekspionert	1	1	66	35,6	440	51,13	F	0,975220187
Ekspionert	1	2	66	36,5	431	27,77	F	0,886336587
Ekspionert	1	3	66	35,3	443	46,98	F	1,007116265
Ekspionert	2	1	66	35,7	416	30	M	0,914299921
Ekspionert	2	2	66	33,6	337	18,29	F	0,888407198
Ekspionert	2	3	66	37,4	551	44,7	F	1,053262913
Ekspionert	3	1	66	40	549	46,45	M	0,8578125
Ekspionert	3	2	66	38,1	607	59,46	M	1,097523338
Ekspionert	3	3	66	34,1	405	36,52	M	1,02139067
Kontroll	1		97	35,8	384	26,9	M	0,836916528
Kontroll	2		97	34	371	35,4	M	0,943924283
Kontroll	3		97	36,3	379	20,3	M	0,792354146
Ekspionert	1		97	33,8	354	25,3	M	0,916754734
Ekspionert	2		97	40	598	44,3	F	0,934375
Ekspionert	3		97	32,7	317	24,9	M	0,906600604
Kontroll	1	1	129	36,4	468	32,1	M	0,970379699
Kontroll	1	2	129	40,6	490,1	41,5	F	0,732329623
Kontroll	2	1	129	36,3	280,1	16,9	M	0,585589436
Kontroll	2	2	129	38,7	305,8	35,4	M	0,527599756
Kontroll	3	1	129	36,5	466,5	33,7	M	0,959341108
Kontroll	3	2	129	38,3	579,8	35,7	F	1,032005208
Ekspionert	1	1	129	37,6	489,5	31,6	M	0,92085057
Ekspionert	1	2	129	38,5	438,4	32,6	F	0,76822486
Ekspionert	2	1	129	35,9	381,7	26,8	F	0,824971251
Ekspionert	2	2	129	41,2	738,2	81	F	1,055558708
Ekspionert	3	1	129	42	674	44,6	M	0,909728971
Ekspionert	3	2	129	36,8	429,6	29,6	F	0,862026897

PCB i lever

Markert	TTS/%	Fett- % pr.v.v %	CB28 -B µg/kg v.v.	CB52 -B µg/kg v.v.	CB101 -B µg/kg v.v.	CB118 -B µg/kg v.v.	CB153 -B µg/kg v.v.	CB138 -B µg/kg v.v.	CB180 -B µg/kg v.v.	Sum PCB µg/kg v.v.
Ekspionert										
torsk dag 0 1	73	66	3,6	8,9	22	19	28	23	7,8	112,3
Ekspionert										
torsk dag 0 2	64	21	1,1	2,6	5,7	4,9	6,9	6	1,9	29,1
Ekspionert										
torsk dag 0 3	72	66	3,8	5,2	20	17	26	22	6,5	100,5

Ekspionert torsk dag 13 1	70	64	4,6	7,4	22	20	29	25	8,1	116,1
Ekspionert torsk dag 13 2	75	71	3,4	5,8	16	13	17	14	4,7	73,9
Ekspionert torsk dag 13 3	74	71	4,3	6,1	15	12	17	15	4,7	74,1
Ekspionert torsk dag 26 1	63	55	3,5	6,5	12	11	14	13	3,9	63,9
Ekspionert torsk dag 26 2	75	71	5,3	4,6	17	13	18	15	4,1	77
Ekspionert torsk dag 26 3	78	76	4,6	8,8	18	14	19	16	4,8	85,2
Ekspionert torsk dag 39 1	76	72	6,1	13	29	21	32	25	7,5	133,6
Ekspionert torsk dag 39 2	76	70	3,4	10	16	13	19	16	5,5	82,9
Ekspionert torsk dag 39 3	69	61	<6	7,1	19	14	22	17	5,1	84,2
Ekspionert torsk dag 52 1	74	71	4,3	10	23	17	27	22	7	110,3
Ekspionert torsk dag 52 2	74	70	3,7	8,4	16	12	18	15	5,5	78,6
Ekspionert torsk dag 52 3	70	66	5,6	16	21	18	28	24	7,8	120,4
Ekspionert torsk dag 66 1 rep	72	69	3,3	10	13	10	15	13	4,2	68,5
Ekspionert torsk dag 66 2 rep	68	68	7,3	22	33	26	40	33	11	172,3
Ekspionert torsk dag 66 3 rep	70	66	5,6	15	27	21	32	26	8,4	135
Ekspionert torsk dag 97 1	70	66	6,9	16	27	22	33	27	8,5	140,4
Ekspionert torsk dag 97 2	74	70	5,3	14	23	17	27	23	7,1	116,4
Ekspionert torsk dag 97 3	77	72	6,7	16	29	22	35	29	9,1	146,8
Ekspionert torsk dag 129 1 rep	62	56	6,7	16	28	24	40	34	10	158,7
Ekspionert torsk dag 129	66	60	7,8	21	31	26	43	38	11	177,8

2 rep										
Eksponert										
torsk dag 129										
3 rep	71	67	6,5	13	24	19	29	25	7,8	124,3
Kontroll torsk										
dag 0 1	69	61	2,6	7	14	11	16	14	4,7	69,3
Kontroll torsk										
dag 0 2	75	71	3	9,6	17	12	18	16	5,5	81,1
Kontroll torsk										
dag 0 3	70	68	2,6	8,5	16	13	19	16	5,3	80,4
Kontroll torsk										
dag 13 1	73	68	2,8	7,7	16	13	21	17	5,8	83,3
Kontroll torsk										
dag 13 2	76	69	3,4	10	22	16	27	23	8,2	109,6
Kontroll torsk										
dag 13 3	75	68	2,6	8,4	16	12	19	16	5,7	79,7
Kontroll torsk										
dag 26 1	57	45	1,7	5,7	9,7	7,4	11	9,6	3,4	48,5
Kontroll torsk										
dag 26 2	74	71	3	10	19	15	24	20	6,8	97,8
Kontroll torsk										
dag 26 3	70	62	2,5	7	13	10	15	13	4,6	65,1
Kontroll torsk										
dag 39 1	73	65	2,4	9,2	13	9,1	14	12	4	63,7
Kontroll torsk										
dag 39 2	69	60	3,3	8,7	18	14	21	18	6,1	89,1
Kontroll torsk										
dag 39 3	68	63	3,7	12	24	19	34	27	9,4	129,1
Kontroll torsk										
dag 52 1	73	70	3,4	12	21	16	27	21	7,4	107,8
Kontroll torsk										
dag 52 2	76	68	3,9	10	18	15	25	21	7,6	100,5
Kontroll torsk										
dag 52 3	75	68	3	10	19	14	23	20	6,4	95,4
Kontroll torsk										
dag 66 1 repl	70	66	3,3	8,5	20	15	25	20	7	98,8
Kontroll torsk										
dag 66 2 repl	73	71	2,7	9,7	19	14	23	19	6,2	93,6
Kontroll torsk										
dag 66 3 repl	76	69	3,1	9,2	15	11	17	15	5,2	75,5
Kontroll torsk										
dag 97 1	78	72	4,7	12	27	21	33	28	9,6	135,3
Kontroll torsk										
dag 97 2	72	67	3,4	10	17	12	20	17	6	85,4
Kontroll torsk										
dag 97 3	67	64	4,8	12	29	25	39	31	10	150,8
Kontroll torsk										
dag 129 1	69	67	4,1	11	22	17	30	24	7,8	115,9
Kontroll torsk										
dag 129 2	67	66	4,6	9,3	24	19	33	27	8,9	125,8
Kontroll torsk										
dag 129 3	74	67	3,5	8,5	17	14	22	19	6,2	90,2
Fórprøve	89	16	<0,5	1,6	1,5	0,85	1,7	1,1	<0,5	6,75

PAH-metabolitter i galle

Analyse av PAH-metabolitter Sedimentforsøk
(SF)

06-mai

Fisk	Dag	Volum	Absorbanse	λ 256- 380	λ 290- 335	λ 341- 383	λ 380- 430
		1:10					
ST1 Pyren		løsning		37,5	1,6	42,9	27,7
		1:10					
ST2 Naftalen		løsning		16,9	8	5,1	0
		1:10					
ST3 Fenantren		løsning		149,1	2,3	9,7	0,3
E-1	52	100 μ l	1,703	6,2	3,9	1,3	0,3
E-1	13	10 μ l	0,071	9	3	2,4	0,4
K-1	13	100 μ l	2,666	5	4,3	0,9	0,4
K-3	13	10 μ l	0,235	3,4	2,1	0,5	0,4
E-3	13	100 μ l	2,191	12,28	4,1	3,8	0,6
E-2	0	100 μ l	1,877	5,4	2,1	0,9	0,5
K-3	0	100 μ l	0,478	2,1	2,4	0,4	0,4
E-3	0	100 μ l	2,565	5,6	3,8	1,1	0,6
E-1	0	100 μ l	1,184	10,5	0,8	1,6	0,4
K-2	0	100 μ l	1,722	6	4	1	0,5
		1:10					
ST1 Pyren		løsning		37,5	1,7	42,9	28,2
		1:10					
ST2 Naftalen		løsning		17,9	8,2	5,4	0,1
		1:10					
ST3 Fenantren		løsning		188,5	2,2	10,8	0,5
11-05-07							
		1:10					
ST1 Pyren		løsning		33,6	2,2	42,7	27
		1:10					
ST2 Naftalen		løsning		14,8	8,5	5,1	0
		1:10					
ST3 Fenantren		løsning		137	3,2	10,8	0,3
E-2	13	100 μ l	1,441	13,1	2,5	4	0,5
K-2	39	100 μ l	2,937	2	1,3	0,5	0,2
K-2	52	100 μ l	1,69	4,3	2,6	0,8	1,4
K-1	52	100 μ l	1,671	2,3	2,6	0,4	0,1
E-2	26	100 μ l	1,374	7,2	2,9	1,7	0,4
E-3	39	100 μ l	1,724	7,5	4	1,8	0,4
E-1	39	100 μ l	2,284	8,6	1,9	2,2	0,4
E-3	52	100 μ l	2,813	6,3	2,7	1,3	0,2
K-3	39	100 μ l	1,407	7,5	1,5	1,2	0,2
K-3	26	100 μ l	2,818	2,6	2	0,6	0,1
		1:10					
ST1 Pyren		løsning		36,1	2,4	44,7	28,8
		1:10					
ST2 Naftalen		løsning		17,1	9,1	5,5	0
		1:10					
ST3 Fenantren		løsning		154,4	3,3	11,4	0,7
K-1	26	100 μ l	2,736	2,7	3,3	0,7	0,4

K-1	39	10 µl	0,029	0,1	0,7	0,1	0
K-2	13						
E-1	26						
K-1	0						
K-2	26	10 µl	0,184	4,8	5,5	1,1	0,7
E-3	26	100 µl	2,792	26,7	6,9	8,9	1,2
E-2	52	100 µl	0,387	2	0,8	0,5	0,1
E-2	39	100 µl	0,665	3,7	2,3	0,8	0,2
K-3	52	100 µl	0,345	1	0,6	0,2	0,1
		1:10					
ST1 Pyren		løsning		36,5	2,3	43,3	29,1
		1:10					
ST2 Naftalen		løsning		18,3	9	5,6	0
		1:10					
ST3 Fenantren		løsning		166,8	3,2	11,2	0,3
12-05-07							
		1:10					
ST1 Pyren		løsning		29,6	1,7	35,6	23,3
		1:10					
ST2 Naftalen		løsning		13,6	7,2	4,5	0
		1:10					
ST3 Fenantren		løsning		125,5	2,6	9,6	0,1
E-11	66	100 µl	1,326	3,3	1,6	0,8	0,2
K-22	66	100 µl	2,138	3,1	2,4	0,5	0,2
K-11	66	100 µl	0,695	1,2	1,5	0,2	1,1
K-13	66	100 µl	2,748	1,6	1,3	0,3	0,1
K-31	66	100 µl	0,914	1	1,3	0,2	0
E-13	66	100 µl	1,49	4,2	3,2	0,9	0,2
E-22	66	100 µl	2,227	7,1	4,4	1,6	0,4
E-31	66	10 µl	0,228	6,2	2,3	1,5	0,3
K-21	66	100 µl	2,898	3,4	2,7	0,6	0,2
E-21	66	100 µl	3,37	41,7	5,9	11,7	1,9
		1:10					
ST1 Pyren		løsning		35,1	2	41,9	28,4
		1:10					
ST2 Naftalen		løsning		17,3	8,9	5,6	-0,1
		1:10					
ST3 Fenantren		løsning		171,4	2,5	11,5	0,2
K-12	66	100 µl	2,218	6,2	4,2	0,7	0,2
E-32	66	100 µl	3,293	7,6	3,7	1,7	0,3
K-23	66						
E-12	66	100 µl	1,844	6,1	2,4	1,4	0,3
K32	66	100 µl	2,526	4,6	3,4	0,7	0,2
E-23	66	100 µl	1,546	6	3,6	1,4	0,3
E-33	66	100 µl	0,608	1,8	0,9	0,4	0
		1:10					
ST1 Pyren		løsning		37,4	1,9	41,3	28,2
		1:10					
ST2 Naftalen		løsning		17,7	8,4	5,4	-0,1
		1:10					
ST3 Fenantren		løsning		184,1	2,3	11,2	0,2
30-08-07							
		1:10					
ST1 Pyren		løsning		0,4	23,9	18,9	12,5
ST2 Naftalen		1:10		0,6	26,3	6,3	0,2

		løsning 1:10					
ST3 Fenantren		løsning		3,6	23,4	7,8	0,4
K-1	97	10 �l	0,937	6,3	3,5	1,2	0,5
K-2	97	100 �l	1,986	4,8	2,9	1	0,4
E-11	129	100 �l	1,091	9,4	2,5	3,5	0,7
		1:10					
ST1 Pyren		løsning		0,6	25,8	19,2	13
		1:10					
ST2 Naftalen		løsning		1	28,5	6,4	0,2
		1:10					
ST3 Fenantren		løsning		3,8	25,5	7,6	0,4
K-31	129	100 �l	0,896	3,1	2,6	0,5	0,2
S-31	129	100 �l	0,229	1,1	0,5	0,3	0,1
K-11	129	100 �l	3,133	3,5	2,5	0,6	0,2
E-12	129	100 �l	0,677	2,6	2,1	0,6	0,3
E-22	129	100 �l	0,26	1,5	0,9	0,3	0,1
K-12	129	100 �l	0,775	1,9	1,7	0,3	0,4
E-21	129	100 �l	1,656	6,5	3,3	1,4	0,4
E-2	97	100 �l	2,874	6,2	4,4	1,5	0,4
K-32	129	100 �l	0,331	1,2	1,1	0,2	0,2
E-32	129	100 �l	0,761	3,7	2	0,6	0,3
		1:10					
ST1 Pyren		l�sning		0,9	27,8	19,7	13
		1:10					
ST2 Naftalen		l�sning		1,3	29,6	6,5	0,2
		1:10					
ST3 Fenantren		l�sning		5,3	26,1	7,6	0,4
E-1	97						
K-22	129	100 �l	0,84	2,5	1,9	0,4	0,2
E-3	97	100 �l	3,533	9,7	3,5	2,2	0,5
K-21	129	100 �l	0,914	2,2	1,9	0,4	0,2

